

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Jana Hurňáková

**VZTAH EXPRESE MARKERŮ KLOUBNÍHO ZÁNĚTU K AKTIVITĚ
REVMATOIDNÍ ARTRITIDY**

*Markers of joint inflammation related to disease activity
in rheumatoid arthritis*

Disertační práce

Praha, 2018

Školitel: prof. MUDr. Karel Pavelka, DrSc.

Pracoviště: Revmatologický ústav

Revmatologická klinika, 1. LF UK

Na Slupi 4

128 50 Praha 2

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 2.1.2018

MUDr. Jana Hurňáková

Identifikační záznam:

HURŇÁKOVÁ, Jana. *Vztah exprese markerů kloubního zánětu k aktivitě revmatoidní artritidy. (Markers of joint inflammation related to disease activity in rheumatoid arthritis)*. Praha, 2018. 96 str., 4 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Revmatologický ústav, Klinika revmatologie 1. LF UK 2018. Školitel Pavelka, Karel.

Abstrakt

Úvod: Revmatoidní artritida (RA) je nejčastější chronické autoimunitní onemocnění synoviálních kloubů projevující se typicky jako symetrická polyartritida drobných ručních kloubů s různou mírou extraartikulárních manifestací. Správné zhodnocení aktivity kdykoliv v průběhu choroby může pomoci k adjustaci terapeutických prostředků s cílem zamezit přirozeně destruktivnímu průběhu této nemoci. Cílem naší práce bylo studovat význam vybraných sérových markerů kloubního zánětu ve vztahu k aktivitě RA vyjádřenou konvenčními ukazateli i pomocí muskuloskeletální ultrasonografie.

Výsledky: V první části naší práce jsme poukázali na vztah sérového calprotectinu k aktivitě RA vyjádřenou klinickými i ultrazvukovými parametry. Navíc jsme prokázali, že calprotectin je nezávislým prediktorem ultrazvukové synovitydy a dokáže rozlišit pacienty, u kterých přes dosažení klinické remise přetrvává reziduální kloubní zánět verifikovaný ultrazvukem. V druhé části projektu jsme provedli detailní analýzu 20 kandidátních sérových biomarkerů a prokázali jsme úzkou asociaci IL-6, IL-7, IL-22, IL-34, YKL-40, CXCL-13, MMP-3, resistinu a visfatinu s klinickou a ultrazvukovou aktivitou RA. Korelace IL1 β , IFN γ a VEGF s některými ze sledovaných ukazatelů zánětů byly rovněž statisticky signifikantní. U IL-8, IL-12p70, IL-17A, IL-33, adiponektinu, leptinu a VCAM jsme vztah s klinickou, laboratorní či ultrazvukovou aktivitou RA neprokázali. Použitím faktorové analýzy jsme vytvořili model komplexní molekulární aktivity složený z 8 biomarkerů: calprotectin, CRP, IL-6, MMP-3, VEGF, resistin, IL-22 a IL-7, který nejlépe reflektuje zánětlivou aktivitu vyjádřenou kompozitním ukazatelem aktivity.

Závěr: Naše výsledky umožnily podrobněji charakterizovat vybrané markery kloubního zánětu ve vztahu k aktivitě RA a zhodnotit jejich možné využití při cílenější monitoraci zánětlivé kloubní aktivity.

Klíčová slova: revmatoidní artritida, markery kloubního zánětu, aktivita nemoci, ultrasonografie

Abstract

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is a common chronic autoimmune disorder characterised by persistent synovitis, typically manifested as symmetric polyarthritis of small hand joints with various extra-articular manifestations. Accurate disease activity measurement is a key component of RA management that facilitates therapeutic optimization in order to slow down the disease progression and to prevent an irreversible joint damage. The aim of this work was to study the role of candidate serum inflammatory markers and their associations with the disease activity in patients with RA presented by traditional variables of disease activity as well as by musculoskeletal ultrasonography.

Results: The first part of our work pointed out relationship between serum calprotectin and clinical as well as ultrasound activity in RA. We have revealed that serum calprotectin is an independent predictor of ultrasound synovitis. Moreover, we have demonstrated the potential of calprotectin to identify patients with residual activity in spite of achieving clinical remission.

In the second part, we have provided a detailed analysis of 20 candidate serum markers and found out a tight associations between IL-6, IL-7, IL-22, IL-34, YKL-40, CXCL-13, MMP-3, resistin and visfatin with clinical and ultrasound activity. Correlations between IL1 β , IFN γ and VEGF with parameters of disease activity were less significant. Contrary, we did not find any associations between IL-8, IL-12p70, IL-17A, IL-33, adiponectin, leptin nor VCAM and disease activity.

Finally, we have developed a model covering underlying pathophysiological processes composed of 8 serum biomarkers: calprotectin, CRP, IL-6, MMP-3, VEGF, resistin, IL-22 and IL-7 that optimally reflects inflammatory activity in RA.

Conclusion: Our results enabled further characterisation of joint inflammatory markers in relation to disease activity. We believe that our work may contribute to more accurate measurement of inflammatory activity in RA and improvement of patients' outcomes.

Key words: rheumatoid arthritis, markers of joint inflammation, disease activity, ultrasonography

Obsah

1. ÚVOD	8
1.1. REVMATOIDNÍ ARTRITIDA	8
1.2. MARKERY KLOUBNÍHO ZÁNĚTU U REVMATOIDNÍ ARTRITIDY	10
1.2.1. CYTOKINY	10
1.2.1.1. TUMOR NEKROTIZUJÍCÍ FAKTOR-A	10
1.2.1.2. INTERLEUKIN-1	11
1.2.1.3. INTERLEUKIN-6	12
1.2.1.4. INTERLEUKIN-7	13
1.2.1.5. INTERLEUKIN-22	14
1.2.1.6. INTERLEUKIN-33	15
1.2.1.7. INTERLEUKIN-34	16
1.2.2. ADIPOCYTOKINY	17
1.2.2.1. LEPTIN	18
1.2.2.2. ADIPONEKTIN	19
1.2.2.3. VISFATIN	20
1.2.2.4. RESISTIN	21
1.2.2.5. DALŠÍ ADIPOCYTOKINY	21
1.2.3. CHEMOKINY	22
1.2.4. CALPROTECTIN	23
1.2.5. MARKERY KLOUBNÍ DESTRUKCE	24
1.3. KONVEČNÍ METODY HODNOCENÍ AKTIVITY REVMATOIDNÍ ARTRITIDY	25
1.4. VÝZNAM MUSKULOSKELETÁLNÍ ULTRASONOGRAFIE V DETEKCI ZÁNĚTU A HODNOCENÍ AKTIVITY REVMATOIDNÍ ARTRITIDY	26
2. HYPOTÉZA A CÍLE	30
3. METODIKA A VÝSLEDKY	31
3.1. ASOCIACE MEZI ULTRAZVUKOVÝM SKÓRE US7 A PARAMETRY KVALITY ŽIVOTA A FYZICKÉ FUNKCE (KOMENTÁŘ K PUBLIKACI ZAŘAZENÉ DO DISERTAČNÍ PRÁCE)	34
3.2. VZTAH SÉROVÉHO CALPROTECTINU K AKTIVITĚ REVMATOIDNÍ ARTRITIDY (KOMENTÁŘE K PUBLIKACÍM ZAŘAZENÝM DO DISERTAČNÍ PRÁCE)	35
3.2.1. HLADINY SÉROVÉHO CALPROTECTINU KORELUJÍ S AKTIVITOU REVMATOIDNÍ ARTRITIDY A JSOU NEZÁVISLÝM PREDIKTOREM ULTRAZVUKOVÉ SYNOVITIDY	35
3.2.2. VÝZNAM STANOVOVÁNÍ SÉROVÉHO CALPROTECTINU U PACIENTŮ S REVMATOIDNÍ ARTRITIDOU V KLINICKÉ REMISI.	39
3.2.3. VÝZNAM STANOVOVÁNÍ SÉROVÉHO CALPROTECTINU U ČÁSTI PACIENTŮ S KLINICKY AKTIVNÍ REVMATOIDNÍ ARTRITIDOU PŘI NORMÁLNÍCH/NÍZKÝCH HLADINÁCH C-REAKTIVNÍHO PROTEINU.	43
3.3. VZTAH DALŠÍCH MODERNÍCH MARKERŮ KLOUBNÍHO ZÁNĚTU K AKTIVITĚ REVMATOIDNÍ ARTRITIDY. VYTVOŘENÍ KOMPLEXNÍHO MODELU SÉROVÝCH BIOMARKERŮ REFLEKTUJÍCÍ ZÁNĚTLIVOU AKTIVITU REVMATOIDNÍ ARTRITIDY.	48
4. DISKUSE	64
4.1. METODY HODNOCENÍ AKTIVITY REVMATOIDNÍ ARTRITIDY	64
4.2. VZTAH SÉROVÉHO CALPROTECTINU K AKTIVITĚ REVMATOIDNÍ ARTRITIDY	65

4.3.	VZTAH DALŠÍCH MODERNÍCH MARKERŮ KLOUBNÍHO ZÁNĚTU K AKTIVITĚ REVMATOIDNÍ ARTRITIDY. VYTVOŘENÍ KOMPLEXNÍHO MODELU SÉROVÝCH BIOMARKERŮ REFLEKTUJÍCÍHO ZÁNĚTLIVOU AKTIVITU REVMATOIDNÍ ARTRITIDY....	68
5.	ZÁVĚR	71
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	72
7.	POUŽITÁ LITERATURA.....	74
8.	SEZNAM PUBLIKACÍ	87
9.	PODĚKOVÁNÍ	95
10.	PŘÍLOHY	96

1. ÚVOD

Revmatoidní artritida (RA) je nejčastější chronické zánětlivé onemocnění synoviálních kloubů projevující se typicky jako symetrická polyartritida drobných ručních kloubů s různou mírou extraartikulárních manifestací. Etiopatogeneze onemocnění není známá, ale předpokládá se, že na vzniku a udržování inflamatorních procesů se podílejí zejména autoreaktivní zánětlivé buňky infiltrující kloubní výstelku. Tento buněčný infiltrát produkuje řadu prozánětlivých molekul (např. cytokinů), které mají zásadní vliv na vznik, amplifikaci a udržování zánětlivých reakcí vedoucích k postupné destrukci tkání muskuloskeletálního systému. Produkované prozánětlivé molekuly jsou často detekovatelné v synoviální tekutině nebo přímo v séru pacientů a jejich hladiny mají vztah ke vzniku a aktivitě choroby nebo jsou odrazem chronicity zánětlivého procesu. Měření sérových koncentrací moderních biomarkerů je proto zajímavým z pohledu studia vzniku onemocnění, hodnocení aktivity kdykoliv v jejím průběhu nebo odpovědi na terapii v dlouhodobém horizontu. Některé práce navíc poukazují na možnost využití měření biomarkerů ve vztahu k optimalizaci terapie s cílem navození remise, zpomalení progresu nemoci a zabránění vzniku ireverzibilních strukturálních změn.

1.1. Revmatoidní artritida

Etiopatogeneze

RA se považuje za nejčastější autoimunitní onemocnění kloubního aparátu. Obecná prevalence v běžné populaci se v průměru pohybuje kolem 0.8 %, s rozmezím od 0.3 do 2.1 %. Incidence se dle různých statistik udává od 10 do 50 na 100 000 obyvatel, s častějším výskytem v severských zemích Evropy a v Severní Americe (Alamanos Y. and Drosos A. A. 2005). Výjimečně vysoká prevalence je mezi některými indiánskými kmeny v USA (až 5.3-8.2 %) (Del Puente A. et al., 1989). Obecně lze tvrdit, že incidence RA klesá od severu k rovníkovým oblastem, kde je naopak velmi nízká. V České republice se incidence odhaduje na 31 na 100 000 obyvatel a prevalence je kolem 0.6 % dospělé populace (Hanova P. et al., 2006). Onemocnění se manifestuje u obou pohlaví a v jakémkoliv věku, ale častěji jsou postižené ženy (v poměru 2-4:1 k mužům), zejména v mladším a premenopauzálním věku (nejčastěji mezi 35. a 50. rokem života). Byl také popsán častější familiární výskyt u příbuzných 1. stupně.

Přibližně 10 % nemocných se séropozitivní RA má postiženého příbuzného a závažná RA se nachází u příbuzných 1. stupně nemocného se seropozitivní RA až 4x častěji, než by se dalo očekávat v běžné populaci. Studie na dvouvaječných dvojčatech prokázaly 3-4% konkordanci, u jednovaječných dvojčat stoupá konkordance až na 15% (Silman A. J. et al., 1993).

Etiopatogeneze RA stále není zcela objasněná. V zjednodušeném modelu lze říci, že onemocnění vzniká u geneticky predisponovaného jedince vlivem zevního a vnitřního prostředí (např. kouření, stres, infekce) (Klareskog L. et al., 2006, Detert J. et al., 2010). Tento proces je velmi složitý a sestává z více kroků, postupně vedoucích k dysregulaci imunitního systému a jeho „nasměrování“ proti vlastním strukturám. Je velmi pravděpodobné, že primární proces prolomení tolerance a tvorba systémové autoimunitní odpovědi se vyvíjí mimokloubně (plíce, střevo, kostní dřeň) (Reynisdottir G. et al., 2014). Dochází k syntéze revmatoidních faktorů a dalších autoprotilátek, které jsou pro RA specifické. Některé pro RA specifické autoprotilátky, jako např. anti-citrulinové, anti-vimentinové nebo nově popsané anti-karbamylované protilátky lze v séru některých jedinců detekovat i několik let před manifestací klinických obtíží a zdá se, že by dokonce mohly mít určitou roli v patogenezi samotného onemocnění (van de Stadt L. A. et al., 2011, Shi J. et al., 2013, Gan R. W. et al., 2015, Brink M. et al., 2016).

V dalším průběhu se zánětlivé procesy relokalizují do cílových tkání, tj. primárně do synoviálních kloubů (Catrina A. I. et al., 2017). Aktivované lymfocyty (zejména CD4⁺ buňky) se akumulují a infiltrují synoviální tkáň, dochází k lokální produkci prozánětlivě působících cytokinů. Synoviální membrána se přeměňuje na vaskularizovanou granulační tkáň, označovanou jako pannus (Shiozawa S. et al., 1983). Tento celulární konvolut složený z lymfocytů, makrofágů, fibroblastů, synoviocytů a mastocytů přerůstá přes chrupavku a díky produkci velkého množství proteolytických enzymů (kolagenáza, stromelyzin, elastáza, katepsin B a G) poškozuje kost, vazy, šlachy a další přilehlé struktury (Ainola M. M. et al., 2005). Důsledkem je postupná destrukce kloubu se všemi funkčními důsledky. Nemoc svým progresivním průběhem vede k významnému omezení funkčních schopností a snížení kvality života (Sokka T. 2003).

1.2. MARKERY KLOUBNÍHO ZÁNĚTU U REVMATOIDNÍ ARTRITIDY

1.2.1. Cytokiny

Lidský imunitní systém zahrnuje velmi složité a koordinované procesy, ve kterých hrají klíčovou roli malé proteiny zvané cytokiny. Cytokiny se podílejí na patogenezi řady zánětlivých a autoimunitních onemocnění. Revmatoidní artritida je typickou modelovou nemocí, která koncept dysbalance specifických pro- a protizánětlivých cytokinů potvrdila na několika úrovních.

Pilotní studie analýzy proteinů a mRNA cytokinů ve tkáních u pacientů s RA prokázaly zvýšenou expresi zejména tumor nekrotizujícího faktoru- α (TNF α), interleukinu-1 (IL-1), interleukinu-6 (IL-6), faktoru stimulujícího kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF) a chemokinu IL-8 a to u všech pacientů zcela nezávisle na podávané terapii. Do jisté míry byla tato zvýšená exprese kompenzována zvýšenou produkcí protizánětlivých cytokinů IL-10 a TGF β (transforming growth factor beta), nebo inhibitorů cytokinů jako jsou receptor pro IL-1 (IL-1R) a solubilní receptor pro TNF. Aktivace homeostatických regulačních mechanismů však v těchto pracích neprokázala dostatečnou neutralizaci prozánětlivého efektu TNF α a IL-1.

1.2.1.1. Tumor nekrotizující faktor- α

Tumor nekrotizující faktor- α (TNF α) je zcela klíčový v patogenezi RA a lze dokonce tvrdit, že v hierarchii cytokinů prozánětlivé kaskády stojí na předních pozicích (Brennan F. M. et al., 1992). Jeho hlavním zdrojem produkce jsou různé imunokompetentní buňky, zejména aktivované Th-lymfocyty, monocyty a makrofágy. TNF α se vyskytuje ve formě transmembránové nebo solubilní, přičemž obě jsou biologicky aktivní. TNF α má pleiotropní účinky, s celou škálou prozánětlivých efektů. První náznak o jeho důležitosti v patogenezi RA pochází z pozorování, ve kterém jeho utlumení v kultuře synoviálních buněk vedlo k významnému snížení tvorby IL-1 a GM-CSF. Později se ukázalo, že inhibice TNF α vedla k potlačení produkce i dalších cytokinů jako je např. IL-6 (Brennan F. M. et al., 1989, Haworth C. et al., 1991). Tyto studie vedly k formulování zcela nové koncepce, a to že prozánětlivé cytokiny jsou u RA propojené v síť, a TNF α stojí na jejím vrcholu jakožto jeden z jejích hlavních regulátorů. Kromě stimulace tvorby různých prozánětlivých cytokinů, zvyšuje TNF α expresi adhezivních molekul na povrchu buněk, např. VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), ICAM-1 (intracellular adhesion molecule) a ELAM-1 (endothelial

leukocyte adhesion molecule/E-selektin-1), čím umožňuje zvýšenou propustnost cév, migraci buněk do ložisek zánětu a infiltraci postižených tkání (Luo S. F. et al., 2010). TNF α aktivací proteáz, degradujících mezibuněčnou hmotu, zrychluje proces kloubní remodelace. Navíc zvyšuje expresi ligandu pro receptor aktivující NF-kB (receptor activator of nuclear factor NFkappaB-ligand – RANK L), který je nezbytný pro diferenciaci prekursorů osteoklastů, čím zvyšuje kostní resorpci a přispívá tak k patogenezi periartikulární, ale i systémové osteoporózy u RA.

Hypotéza, že TNF α je klíčový v patogenezi RA, byla úspěšně testována na zvířecích modelech, např. kolagenem indukované artritidy a sloužila jako rámec pro provedení klinických hodnocení u lidí (Williams R. O. et al., 1992, Elliott M. J. et al., 1993, Feldmann M. et al., 2004). Tyto práce byly revoluční a potvrdily, že cílena inhibice TNF α signifikantně potlačuje aktivitu onemocnění, zastavuje radiologickou progresi a vede ke zlepšení klinických projevů RA.

1.2.1.2. Interleukin-1

Interleukin-1 (IL-1) je další z cytokinů s výraznými prozánětlivými účinky, který hraje důležitou roli v mechanismech vrozené imunity. Tvoří významnou součást tzv. cytokinové sítě, která zajišťuje regulaci a koordinaci různých složek imunitní obrany organismu v případě vystavení infekci, zánětu, poranění nebo jako odpověď na tkáňové poškození. V cirkulaci se vyskytuje ve dvou izoformách: IL-1 α a IL-1 β (Arend W. P. and Gabay C. 2000). Obě izoformy mají téměř identickou biologickou aktivitu, rozdíl mezi nimi je v místě jejich sekrece. Na rozdíl od IL-1 α , kterého největšími producenty jsou keratinocyty a endoteliální buňky, je IL-1 β produkován hlavně aktivovanými monocyty a makrofágy. K jeho syntéze dochází po aktivaci Toll-like receptorů na makrofázích a dalších typech imunokompetentních buněk, a to vlivem působení infekčního agens nebo jako odpověď na jakékoliv tkáňové poškození (Kay J. and Calabrese L. 2004). Nejdříve dochází k genové expresi a syntéze inaktivního prekursoru IL-1 (proIL-1), který je v druhém kroku vlivem proteolytického intracelulárního komplexu označovaného jako inflamazom, přeměněn na biologicky účinný cytokin IL-1 β (Netea M. G. et al., 2010). IL-1 je silným induktorem produkce některých prozánětlivých mediátorů jako například TNF α a IL-6, dále různých prostaglandinů, které zodpovídají za značnou část lokálních i systémových projevů

(Dayer J. M. et al., 1986). Je také induktorem syntézy reaktantů akutní fáze, spolu s ostatními cytokiny působí stimulačně na růst a diferenciaci hematopoetických buněk (Burger D. and Dayer J. M. 2002, Gruys E. et al., 2005). V endoteliálních buňkách stimuluje expresi adhezivních molekul VCAM, ICAM a ELAM. Stimuluje synoviocyty a chondrocyty k produkci kolagenáz, čímž se podílí na destrukci chrupavky. Indukcí exprese RANKL napomáhá diferenciaci a aktivaci osteoklastů, čímž přispívá ke zvýšené kostní resorpci a tvorbě kostních erozí (Wei S. et al., 2005, Zwerina J. et al., 2007). IL-1 se prakticky synchronně studoval u RA spolu s TNF α a byl opakovaně prokázán jeho synergický prozánětlivý efekt. I přes četné důkazy o jeho významu v patogenezi RA, jeho cílená inhibice nevedla k očekávanému potlačení zánětlivých projevů nemoci (Burger D. et al., 2006).

1.2.1.3. Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) představuje další z klíčových prozánětlivých cytokinů důležitých v patogenezi RA. Má řadu pleiotropních účinků a jeho excesivní tvorba u RA je odpovědná za řadu lokálních a systémových projevů nemoci. IL-6 je produkován zejména aktivovanými makrofágy a lymfocyty a u pacientů s RA i synoviálními fibroblasty. Jeho zvýšené koncentrace byly pozorovány jak v séru, tak i v synoviální tekutině pacientů. Pro IL-6 je zcela typická indukce tvorby reaktantů akutní fáze, například C-reaktivního proteinu (CRP), sérového amyloidu a haptoglobinu. IL-6 se podílí na aktivaci vaskulárních endoteliálních buněk a má také vliv na regulaci exprese chemokinů a adhezivních molekul (Lipsky P. E. 2006). Nadprodukce IL-6 snižuje syntézu albuminu a transferinu a indukuje tvorbu hepcidinu, čímž přispívá ke vzniku anémií chronických chorob. IL-6 indukuje také trombocytózu zvýšenou diferenciací megakaryocytů, je růstovým a diferenciačním faktorem B-lymfocytů a podílí se tak na tvorbě protilátek. Zvýšením funkce osteoklastů přispívá k osteoporóze u nemocných s RA. Někteří autoři popsali úzkou asociaci sérových hladin IL-6 s jinými reaktanty akutní fáze a aktivitou nemoci vyjádřenou kompozitními indexy. V nedávno publikované „head-to-head“ studii (IL-6 vs. CRP) bylo prokázáno, že IL-6 lépe koreluje s počtem oteklých kloubů než CRP (Baillet A. et al., 2015). Zdá se, že monitorování IL-6 v séru může navíc pomáhat při hodnocení odpovědi na léčbu a predikci rentgenové progresy (Knudsen L. S. et al., 2008, Smolen J. S. et al., 2008, Baillet A. et al., 2015).

Navíc řada provedených preklinických a klinických studií prokázala, že látky vedoucí k neutralizaci účinku IL-6 významně potlačují aktivitu RA a zpomalují strukturální progresi.

1.2.1.4. Interleukin-7

Interleukin-7 (IL-7) je známý jako potentní lymfopoetický cytokin a důležitý stimulátor lymfoidních prekurzorů (Hofmeister R. et al., 1999). Strukturálně (přítomností čtyř alfa-helikálních úseků v jejich polypeptidovém řetězci) se řadí do rodiny IL-2/IL-15 cytokinů. Je produkován zejména stromálními buňkami kostní dřeně, dále epiteliálními a endoteliálními buňkami, fibroblasty a buňkami hladkého svalstva. IL-7 má vliv na proliferaci, přežití a diferenciaci naivních a paměťových T-lymfocytů (Fry T. J. and Mackall C. L. 2002). Působí jako růstový faktor hemopoetických buněk a podílí se na vývoji různých stádií T-buněk v tymu v rámci procesu pozitivní a negativní selekce (Jiang Q. et al., 2005).

Bylo popsáno, že IL-7 a jeho receptor (IL-7R) jsou ve zvýšené míře exprimovány v synoviální tkáni pacientů s RA a že exprese receptoru pro IL-7 signifikantně koreluje s počtem T-lymfocytů a sérovými koncentracemi IL-7 (van Roon J. A. et al., 2005, Pickens S. R. et al., 2011). Bylo také prokázáno, že u pacientů s RA dochází v synoviální tekutině k významnému zvýšení jeho koncentrace, a to až 30-násobně ve srovnání s pacienty trpícími osteoartrózou (van Roon J. A. et al., 2005). Na druhou stranu, naměřené sérové koncentrace IL-7 v periférní cirkulaci jsou diskrepantní, a tudíž předmětem diskuzí. Autoři dvou studií demonstrovali, že u pacientů s RA dochází ve srovnání se zdravými kontrolami ke zvýšení koncentrace IL-7 v séru, i když je nutné zmínit, že naměřené hodnoty byly u jednotlivých studií značně variabilní (van Roon J. A. et al., 2003, Hitchon C. A. et al., 2004). Jiní autoři naopak popsali nízké sérové koncentrace tohoto interleukinu (Ponchel F. et al., 2005). Je možné, že rozdílné koncentrace IL-7 v séru reflektují různé patofyziologické děje probíhající v čase a odrážejí tak dynamiku procesů RA.

Zdá se, že IL-7 by mohl mít významný imunoregulační vliv na kostimulaci autoreaktivních CD4⁺ T-buněk. Právě interakce mezi CD4⁺ T-lymfocytů a makrofágů hraje důležitou roli ve zprostředkování patologické imunitní odpovědi u RA, která

vede k udržování chronicity procesu. IL-7 se s největší pravděpodobností velmi významně podílí na zprostředkování této kooperace. Úzký vztah mezi IL-7 a synoviálními CD4⁺ T-buňkami dokládají výsledky studie, ve které byl po stimulaci interleukinem-7 prokázán významný nárůst synoviálních CD4⁺ T-buněk a synoviálních makrofágů. Tento vztah neplatil pro IL-7 a periferní CD4⁺ T-buňky cirkulující v krvi (van Roon J. A. et al., 2005).

Další důležitou funkcí IL-7 u RA je aktivace osteoklastogeneze. IL-7 má vliv na diferenciaci makrofágů v osteoklasty, a to aktivací T-buněk a sekrecí klíčového osteoklastogenního cytokinu RANKL, který je zodpovědný za zvýšený kostní úbytek asociovaný s chronickým zánětem u pacientů s RA (Torraldo G. et al., 2003).

I když jsou vědomosti o skutečném významu IL-7 v patofyziologii chronického zánětu u RA zatím limitované, zdá se, že IL-7 ve značné míře přispívá k bludnému kruhu patologických procesů. Lze zatím pouze hypotetizovat, zda by neutralizace IL-7 vedla k efektivnímu potlačení chronického zánětu a zlepšení prognózy nemocných s RA.

1.2.1.5. Interleukin-22

Mezi nově popsané cytokiny u RA patří interleukin-22 (IL-22), který řadíme do rodiny cytokinů IL-10. Se samotným IL-10 sdílí přibližně 25% kódující aminokyselinové sekvence (Dumoutier L. et al., 2000). Na rozdíl od IL-10, který je považován za protizánětlivý, IL-22 indukuje spíše prozánětlivou odpověď. IL-22 je produkovaný různými buňkami imunitního systému jako jsou například aktivované CD4 T-lymfocyty, Th17 lymfocyty nebo NK buňky (natural killer cells). Jeho zvýšená exprese byla prokázána v synoviálních fibroblastech a makrofázích revmatoidního pannu. Účinky IL-22 jsou zprostředkovány receptorem pro IL-22 (IL-22R1), jehož exprese byla nalezena na synoviálních fibroblastech, ale nikoli na makrofázích. IL-22 indukuje proliferaci a expresi MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), čímž spouští zánětlivou odpověď v synoviální tkáni, a to zejména indukcí proliferace synoviálních fibroblastů a produkci dalších cytokinů, které jsou pro tvorbu revmatoidního pannu klíčové (Ikeuchi H. et al., 2005). Za určitých okolností dokáže indukovat expresi prozánětlivých cytokinů, jako IL-6, chemokinů a proteinů akutní fáze v játrech. Bylo

také prokázáno, že IL-22 aktivuje signální dráhu JAK/STAT, a dále také kinázy ERK, JNK a p38 MAPK - enzymy odpovědné za řadu prozánětlivých odpovědí.

V jedné ze studií byly prokázány jeho signifikantně vyšší koncentrace v synoviální tekutině pacientů s RA ve srovnání s pacienty s osteoartrózou. Také se ukázalo, že koncentrace IL-22 v synoviální tekutině korelovaly se sérovými koncentracemi revmatoidních faktorů a anti-citrulinových protilátek u RA (Ikeuchi H. et al., 2005).

V posledních letech se hromadí důkazy o tom, že IL-22 by mohl mít roli v patogenezi destruktivního poškození u RA. Diskutovaným mechanismem je IL-22 indukovaná exprese RANKL, který spouští osteoklastogenezi. Autoři v jedné studii sledovali pacienty s RA, kteří měli kloubní symptomatologii kratší než 3 měsíce po dobu dvou let. Zjistili, že až 33% vyšetřených s vyššími hladinami IL-22 mělo již na počátku sledování erozivní poškození. Po dvou letech se u dalších 25% nemocných se zvýšenými hladinami IL-22 vytvořily nové eroze. Naopak, u pacientů s normálními hladinami IL-22 se erozivní poškození neobjevilo. Autoři tedy předpokládají potenciální roli IL-22 jako prediktivního markeru časného erozivního a agresivnějšího průběhu RA.

Výsledky publikované práce s velmi časnou RA navíc prokázaly, že zvýšené hladiny IL-22 v úvodu onemocnění jsou asociované s přítomností kostních erozí a také mají potenciál predikovat další radiografickou progresi a agresivnější průběh onemocnění (Leipe J. et al., 2011). Z praktického hlediska se tedy IL-22 jeví jako zajímavý marker z pohledu identifikace skupiny nemocných s rychlou radiografickou progresí.

1.2.1.6. Interleukin-33

Intenzivní výzkum v posledních letech poukázal také na úlohu interleukinu-33 (IL-33) v patogenezi revmatoidní artritidy. IL-33 je nově popsáným členem cytokinové rodiny IL-1, do které mimo jiné patří IL-1 α , IL-1 β a IL-18. Největším producentem tohoto interleukinu jsou synoviální fibroblasty a makrofágy. K produkci IL-33 dochází nejčastěji vlivem účinku TNF α a IL-1. Platí zde také opačný vztah, a tedy že IL-33 je důležitým spouštěčem aktivace synoviálních fibroblastů pomocí TNF α . Účinek IL-33 je zprostředkován navázáním na ST2 (Interleukin 1 receptor-like 1) a IL-1RAP (IL-1

receptor accessory protein) s následnou aktivací komplexu MYD88 (primary-response protein 88). Autoři recentní práce na myších modelech demonstrovali, že IL-33 dokáže přímo aktivovat žírné buňky, které posléze uvolňují řadu prozánětlivých cytokinů a chemokinů včetně IL-1, IL-6, GM-CSF, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) a MIP-1 (macrophage inflammatory protein-1). Zdá se, že IL-33 stimuluje také Th2 buňky, NK buňky a NK T buňky a sekreci cytokinů IL-4 (interleukinu-4), IL-5 (interleukinu-5) a IL-13 (interleukinu-13), které vedou k indukci aktivace B buněk a tím i ke zvýšené produkci imunoglobulinů IgM (Sellam J. et al., 2016). Navíc IL-33 spouští typickou odpověď Th1 buněk produkcí TNF α a interferonu γ (IFN γ). Výsledky nedávno publikované studie poukázaly na to, že pacienti s RA mají v synoviální tekutině signifikantně vyšší koncentrace IL-33 než pacienti s osteoartrózou (OA). Koncentrace IL-33 byly signifikantně vyšší zejména u pacientů s RA s vysokou aktivitou ve srovnání se střední nebo nízkou aktivitou nemoci podle kompozitního indexu DAS28 (Disease Activity Score Index) a korelovaly s počtem citlivých a oteklých kloubů. Pacienti s vyššími koncentracemi IL-33 měli také vyšší titry revmatoidních faktorů, anti-citrulinových protilátek a měli častější erozivní kloubní a orgánové plicní postižení v rámci RA (Tang S. et al., 2013). Jiní autoři prokázali úzkou asociaci sérových koncentrací IL-33 a titrů autoprotilátek typických pro RA (Mu R. et al., 2010). Korelace mezi expresí IL-33 v synoviální tekutině a séru pacientů stejně jako jeho asociace s titry autoprotilátek poukazuje na důležitou roli IL-33 v lokální patogenezi RA (Tang S. et al., 2013).

1.2.1.7. Interleukin-34

K nově identifikovaným cytokinům u RA patří také interleukin-34 (IL-34), který má aktivitu růstového faktoru hemopoetických buněk. IL-34 má podobnou roli jako makrofágy-stimulující faktor MCSF-1 (macrophagy-colony stimulating factor-1), oba jsou totiž důležitými regulátory mononukleárních fagocytů. IL-34 sdílí s cytokinem MCSF-1 společný receptor CSF-1R, což vysvětluje funkční překryv těchto dvou cytokinů (Lin H. et al., 2008). Tento receptor je specificky exprimován na monocitech a makrofázích, jeho exprese na jiných typech buněk imunitního systému nebyla prokázána. Právě aktivované makrofágy jsou dominantně zastoupeným infiltrujícím typem buněk synoviální výstelky postižené zánětem a IL-34 je jejich potentním aktivátorem. IL-34 je v mnoha aspektech podobným cytokinem jako MCSF-1. Má

ekvivalentní vliv na růst, diferenciaci a proliferaci lidských monocytů a makrofágů jako MCSF-1, a dokáže také pomocí aktivace RANKL indukovat osteoklastogenezi. U RA je IL-34 vlivem TNF α a IL-1 exprimován ve zvýšené míře v synoviálních fibroblastech a makrofázích. Bylo prokázáno, že zvýšená exprese IL-34 je asociovaná se zvýšenou expresí TNF α , IL1 β a IL-17 (interleukinu-17). V posledních letech se objevují také důkazy o tom, že IL-34 je schopný indukovat produkci jiných prozánětlivých cytokinů a chemokinů, např. IL-6 a IL-8.

Recentně byl potvrzen vztah exprese IL-34 v synoviální membráně k závažnosti histologického nálezu synovitidy. Práce na bioptických vzorcích kloubní synovie pacientů s RA totiž prokázala signifikantní asociaci zvýšené exprese IL-34 v synoviálních fibroblastech s histologickou závažností synovitidy kloubů (Chemel M. et al., 2012). Autoři jiné studie poukázali na fakt, že koncentrace IL-34 v synoviální tekutině pozitivně korelovaly s koncentracemi IL-34 v sérech pacientů a také se zánětlivou aktivitou onemocnění (Moon S. J. et al., 2013). Vzhledem k schopnosti IL-34 indukovat aktivaci RANKL, vznikla otázka, zda by IL-34 mohl mít vliv na tvorbu kostních erozí (Baud'huin M. et al., 2010). Autoři nedávno publikované studie zaměřené na určení praktického významu schopnosti IL-34 spouštět osteoklastogenezi ve své práci vyšetřili 100 pacientů s RA a zjistili, že pacienti s vyššími sérovými hladinami IL-34 měli po 1.6 letech sledování rychlejší radiografickou progresi určenou modifikovaným Sharp van der Heijde skóre a poukázali tak na roli IL-34 jako potentního prediktoru následné radiografické progresy u pacientů s RA (Chang S. H. et al., 2015).

1.2.2. Adipocytokiny

Adipocytokiny, nebo také adipokiny, jsou cytokiny tvořené buňkami tukové tkáně, adipocyty, z čehož plyne i jejich název. Jejich produkce však není limitována pouze na adipocyty, ale byla nalezena i u řady imunokompetentních buněk, např. rezidentních makrofágů, či synoviálních fibroblastů. Dnes je známo, že adipocytokiny mají jak metabolické, tak i imunomodulační funkce. Adipocyty a rezidentní makrofágy produkují řadu prozánětlivých cytokinů. Podle některých autorů až jedna třetina celkové produkce TNF α a IL-6 pochází právě z tukové tkáně (Fantuzzi G. 2005). V poslední době tak vznikl zcela nový koncept, kde je tuková tkáň chápána jako

endokrinně aktivní orgán produkující řadu působků a biologicky aktivních látek a stává se tak velmi atraktivním cílem výzkumu ve vztahu k různým zánětlivým chorobám (Kershaw E. E. and Flier J. S. 2004). V současné době je známo více než 50 různých adipokinů. Jako první z nich byl popsán leptin.

1.2.2.1. Leptin

Leptin je malý peptidový hormon velikosti 16kDa syntetizovaný převážně adipocyty. Jeho funkce je úzce spjatá s regulací příjmu potravy a výdejem energie. Reguluje tělesnou hmotnost signalizací nutričního stavu organismu centrálnímu nervovému systému. Tato signalizace je zprostředkována vazbou na leptinový receptor, jehož strukturální část je v mnoha aspektech podobná receptorům pro cytokiny. Nejvyšší stupeň homogenity byl popsán s receptory pro IL-6 a G-CSF (granulocyty-stimulující faktor). I to je jedním z důvodů, proč se v posledních letech výzkum zaměřil na vztah leptinu s imunitním systémem a jeho funkci při autoimunitních procesech.

Po aktivaci leptinového receptoru dochází ke spuštění mnohočetných signalizačních drah (JAK/STAT, MAPK/ERK, PI3K/Akt, AMPK), z nichž každá zprostředkovává rozdílné aspekty působení (Tian G. et al., 2014). Samotná exprese leptinu je stimulovaná zánětem, např. při akutní infekci. Leptin dále stimuluje makrofágy a ostatní imunokompetentní buňky k produkci širokého spektra prozánětlivých cytokinů a podílí se na diferenciaci Th1 lymfocytů (Mattioli B. et al., 2005, Wong C. K. et al., 2007). Leptin má také roli růstového faktoru, stimuluje proliferaci endoteliálních buněk, podporuje angiogenezi a neovaskularizaci. Role leptinu v patogenezi vzniku artritidy byla zkoumána ve dvou experimentálních studiích na myších modelech. Tyto studie prokázaly, že myši s deficientním leptinem měly méně výraznou proliferaci synovie, nižší humorální odpověď a byly chráněné před vznikem experimentálně indukované artritidy (Hultgren O. H. and Tarkowski A. 2001, Busso N. et al., 2002).

Zajímavé výsledky přinesla také práce švédských autorů, která se zaměřila na roli tohoto adipocytokinu u RA. Autoři v ní prokázali signifikantně zvýšené koncentrace v plasmě pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami. Koncentrace leptinu v synoviální tekutině byly naopak signifikantně nižší, významně ovšem korelovaly s počtem leukocytů v kloubní tekutině a zároveň s koncentracemi leptinu v současně odebraných

vzorcích plasmy. Tento fakt autoři vysvětlili hypotézou, že u pacientů s aktivní RA došlo pravděpodobně k lokální konzumpci leptinu v kloubech aktivním zánětlivým procesem (Bokarewa M. et al., 2003). Koncentrace leptinu v plasmě a v synoviální tekutině byly v této studii asociovány s délkou trvání onemocnění, přičemž nejvyšší byly nalezeny u pacientů s etablovanou RA trvající déle než 20 let. Většina prací neprokázala vliv leptinu na rentgenové poškození kloubů. Pouze v jedné studii bylo paradoxně popsáno, že zvýšené hladiny leptinu reflektovaly menší rentgenové poškození. Tento vztah však neplatil po adjustaci hodnot k hodnotám BMI (body mass index) pacientů.

1.2.2.2. Adiponektin

Jako další z významných adipokinů byl nezávisle čtyřmi výzkumnými skupinami popsán adiponektin s alternativními názvy Acrp30 (adipocyte complement-related protein of 30 kDa), apM1 (adipose most abundant gene transcript 1), AdipoQ nebo GBP28 (gelatin binding protein of 28 kDa) (Scherer P. E. et al., 1995, Hu E. et al., 1996, Maeda K. et al., 1996, Nakano Y. et al., 1996). Jeho hlavním producentem jsou převážně adipocyty, je však také exprimován buňkami kosterního a srdečního svalu (Pineiro R. et al., 2005). Dalším zdrojem jsou aktivované fibroblasty synoviální membrány (Tan W. et al., 2009). Buňky produkující adiponektin exprimují oba typy trans-membránových receptorů, AdipoR1 a AdipoR2 (Yamauchi T. et al., 2003). Jako další potenciální receptory pro adiponektin byly nově popsány PAQR3 a PAQR10 (progesterin and adipoQ receptor family member 3 a 10) (Gonez L. J. et al., 2008, Garitaonandia I. et al., 2009). Adiponektin je známý především pro své antiaterogenní účinky (Ohashi K. et al., 2012). V kontextu zánětu je považován převážně za mediátor s anti-inflamatorními účinky, indukuje expresi protizánětlivého cytokinu IL-10 (Kumada M. et al., 2004), naopak potlačuje tvorbu prozánětlivého TNF α . Transkripce samotného adiponektinu v adipocytech je potlačována zvýšenou produkcí IL-6 (Fasshauer M. et al., 2003). Role adiponektinu v patogenezi RA ovšem není dosud objasněná, navíc studie zabývající se vlivem adiponektinu na zánětlivé projevy u RA přinesly do značné míry diskrepantní výsledky. Liší se údaje o hladinách adiponektinu v séru a synoviální tekutině pacientů s RA ve srovnání se zdravými jedinci (Otero M. et al., 2006, Tan W. et al., 2009), nejasné jsou i asociace koncentrací adiponektinu ve vztahu k aktivitě RA či radiografické progresi (Ebina K. et al., 2009). U pacientů s RA

byl souhlasně popsán úzký vztah nízkých hladin adiponektinu s metabolickým syndromem. Autoři různých prací se také shodují na tom, že adiponektin by mohl mít důležitý vliv na proces aterogeneze u pacientů s RA (Gonzalez-Gay M. A. et al., 2008).

1.2.2.3. Visfatin

Dalším z významných adipocytokinů je visfatin, který byl popsán již v 90. letech minulého století jako PBEF (pre-B-cell colony-enhancing factor) (Samal B. et al., 1994). Později byl tento adipocytokin přejmenován z původního názvu právě na dosud všeobecně používaný visfatin, což mělo reflektovat jeho sekreci predominantně viscerální tukovou tkání (Fukuhara A. et al., 2005). Visfatin je kromě tukové tkáně produkován i různými buňkami imunitního systému (Rongvaux A. et al., 2002, Jia S. H. et al., 2004). U pacientů s RA byla jeho zvýšená exprese zjištěna v synoviálních fibroblastech, a to zejména v místě invaze revmatoidního panu do kosti. Jeho zvýšené koncentrace byly zjištěny také v séru, synoviální tekutině a synoviální membráně u pacientů s RA. Visfatin sám aktivuje transkripční faktor NF-kappaB a podílí se tak na indukci tvorby IL-6, IL-8, MMP-1 (metalloproteinase-1), MMP-3 (metalloproteinase-3) v synoviálních fibroblastech, a IL-6 a TNF α v monocytech (Brentano F. et al., 2007). Visfatin byl popsán jako důležitá součást nově definované zánětlivé cesty vedoucí ke vzniku manifestní artritidy a udržování chronicity zánětlivého procesu. Výsledky několika prací souhlasně potvrdily, že vysoké koncentrace visfatinu v synoviální tekutině i v séru pacientů s RA jsou asociovány s těžkým průběhem nemoci (Rho Y. H. et al., 2009, Alkady E. A. et al., 2011, Sglunda O. et al., 2014). Visfatin navíc stimuluje tvorbu matrixových metaloproteináz MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 a ADAMTS-5 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4, -5) a snižuje tvorbu proteoglykanu, čímž přispívá k destrukci kloubů (Gosset M. et al., 2008). V souladu s tímto zjištěním byl recentně popsán jeho vliv na strukturální poškození u RA. Jedna z našich novějších prací prokázala signifikantní pokles hladin visfatinu po 3 měsících efektivní léčby. Autoři této studie rovněž prokázali, že pokles koncentrací visfatinu po 3 měsících predikuje další zlepšení aktivity nemoci hodnocené dle kompozitního indexu DAS28 i po 12 měsících terapie (Sglunda O. et al., 2014). Visfatin je tak možné považovat za další kandidátní molekulu pro cílenou terapii RA,

nicméně dosud není jasné, jaké metabolické konsekvence by mohla mít blokáda vybraných adipocytokinů u lidí.

1.2.2.4. Resistin

Resistin byl poprvé identifikován v tukové tkáni experimentálních myší a byl dlouho považován za mediátor inzulínové rezistence (Steppan C. M. et al., 2001). Ačkoliv lidský a myší resistin vykazují na úrovni proteinu přibližně 59% homologii, místa jejich exprese jsou odlišná (Ghosh S. et al., 2003). U myší je resistin produkován hlavně tukovými buňkami, u lidí je syntetizován převážně buňkami imunitního systému, zejména makrofágy, dendritickými buňkami, B-lymfocyty a plazmatickými buňkami synoviální membrány, v menší míře byla jeho exprese prokázána také v adipocytech a svalových buňkách (Nagaev I. and Smith U. 2001, Patel L. et al., 2003). Kromě jeho antagonistického účinku k účinkům inzulínu byl resistin současně identifikován i jako prozánětlivý cytokin. Vlivem zánětlivého prostředí dochází k expresi resistinu (Kaser S. et al., 2003), který je pak schopen zpětnovazebně produkovat kromě sebe samého i další klíčové prozánětlivé cytokiny, například $\text{TNF}\alpha$, IL-6 (Bokarewa M. et al., 2005). U experimentálních myších modelů způsobuje aplikace resistinu do kloubu leukocytární infiltraci a hyperplazii synoviální membrány s destruktivním poškozením kloubu (Bokarewa M. et al., 2005). Jeho důležitou roli lze předpokládat také v patogenezi RA u lidí. Resistin byl detekován v synoviální tekutině jak u pacientů s RA tak OA, ale koncentrace resistinu byly u pacientů s RA asi desetkrát vyšší než u pacientů s OA a pozitivně korelovaly s tradičně stanovovanými markery zánětu (CRP, FW) (Senolt L. et al., 2007). Gonzalez-Gay ve své práci demonstroval rychlý pokles koncentrace sérového resistinu (Gonzalez-Gay M. A. et al., 2008), ale ne adiponektinu (Gonzalez-Gay M. A. et al., 2008) po úspěšné léčbě infliximabem (anti- $\text{TNF}\alpha$ blokátor) u pacientů s aktivní RA.

1.2.2.5. Další adipocytokiny

Ve skupině adipocytokinů byly také popsány vaspin a omentin. Vaspin (visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor) byl poprvé identifikován v roce 2005 jako adipocytokin s inzulín-senzitizujícím účinkem produkováný viscerálním tukem myší s metabolickým syndromem (Hida K. et al., 2005). Vaspin vykazuje taktéž protizánětlivé účinky, potlačuje produkci leptinu, resistinu a $\text{TNF}\alpha$, naopak zvyšuje

expresi adiponektinu. U omentinu byl kromě inzulín-senzitizujícího účinku (Schaffler A. et al., 2005) popsán také vliv na vazodilataci a angiogenezi zprostředkovanou aktivací prozánětlivé signalizační cesty NF- κ B (via the nuclear factor kappa B signaling pathway) (Tan B. K. et al., 2010). Role těchto adipocytokinů byla následně zkoumána i ve vztahu k patogenezi RA. Skupina našich autorů se ve své práci zaměřila na stanovení hladin vaspinu a omentinu v synoviální tekutině pacientů s RA a OA. Bylo zjištěno, že zatímco koncentrace omentinu byly signifikantně nižší v synoviální tekutině pacientů s RA ve srovnání s OA a signifikantně negativně korelovaly s koncentracemi anti-citrulinových protilátek a revmatoidních faktorů u pacientů s RA, koncentrace vaspinu byly signifikantně vyšší v synoviální tekutině nemocných s RA oproti kontrolní skupině s OA, a jejich koncentrace korelovaly s kompozitním indexem DAS28 u RA (Senolt L. et al., 2010). Velmi zajímavá práce z roku 2015 také prokázala, že pacienti s artralgiemi, kteří měli vysoké hladiny vaspinu, měli také vyšší riziko vývoje do manifestní revmatoidní artritidy (Majjer K. I. et al., 2015). Zdá se, že vaspin by mohl mít určitou prediktivní roli ve vývoji nemoci z preklinického stádia do stádia manifestní RA.

Velmi recentně byl ve vztahu k patogenezi RA popsán progranulin, cytokin ze skupiny adipocytokinů, který byl ve zvýšené míře exprimován v synoviálních buňkách kloubů a jeho zvýšené koncentrace byly detekovány v synoviální tekutině pacientů s RA (Cerezo L. A. et al., 2015). Zajímavým zjištěním byl také fakt, že progranulin měl protizánětlivé účinky zprostředkované vazbou na receptor pro TNF α s následnou bloádou jeho signalizační dráhy (Tang W. et al., 2011). Progranulin také účinně potlačoval destrukci chrupavky inhibicí metaloproteináz ADAMTS-7/ADAMTS-12 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-7, -12) (Guo F. et al., 2010).

1.2.3. Chemokiny

CXCL13 je součástí CXC rodiny chemokinů. CXCL13 působí především jako chemoatraktant B-lymfocytů (Legler D. F. et al., 1998). Váže se na CXCR5 receptory, které jsou exprimovány na B-lymfocytech a folikulárních Th buňkách (Legler D. F. et al., 1998, Breitfeld D. et al., 2000, Schaerli P. et al., 2000). CXCR5 jsou ve zvýšené míře exprimovány i na lidských osteoblastech a jejich aktivace pomocí ligandu

CXCL13 indukuje uvolnění extracelulárních enzymů degradujících matrix (Lisignoli G. et al., 2003). Z toho plyne důležitá role CXCL13 v procesu kostní remodelace. Tato data poukazují na význam CXCL13 při kostní destrukci dependentní na interakcích závislých na B-buňkách, jako i od mechanismů na B buňkách nezávislých. U pacientů s RA byla pozorována zvýšená exprese mRNA CXCL13 v zánětem postižené synoviální tkáni (Shi K. et al., 2001). Podobně byly pozorovány zvýšené koncentrace CXCL13 v sérech pacientů s RA (Rioja I. et al., 2008), a naopak pokles po úspěšném залечení TNF α inhibitory. V jedné studii se CXCL13 ukázal jako nezávislý prediktor strukturální progresu RA a jeho zvýšené koncentrace prakticky vylučovaly šanci na klinickou remisi nemoci (Meeuwisse C. M. et al., 2011).

1.2.4. Calprotectin

Ve vztahu k RA je z několika pohledů zajímavý biomarker sérový calprotectin (S100A8/9 (Foell D. and Roth J. 2004), L1 protein (Andersson K. B. et al., 1988), MRP8/MRP14 (Odink K. et al., 1987), calgranulin A/B (Wilkinson M. M. et al., 1988)). Calprotectin je heterotetramer složený ze dvou kalcium vázících proteinů, patří do rodiny S100 proteinů. Calprotectin je hlavním leukocytárním proteinem, který tvoří přibližně 40-60 % obsahu cytosolického proteinu neutrofilů a monocytů a makrofágů (Dale I. et al., 1985). K uvolňování calprotectinu dochází během interakcí monocytů s endotelem, který je aktivován zánětem (Frosch M. et al., 2000). Jedná se tedy o marker, který je uvolňován lokálně v místě zánětu a tedy přímo odráží množství aktivovaných leukocytů v postiženém kloubu. Tímto se zásadně liší od jiných proteinů akutní fáze, které jsou produkovány hepatocyty v játrech (Hammer H. B. et al., 2007). Calprotectin se po uvolnění z imunokompetentních buněk váže na toll-like receptor-4 (TLR-4) exprimovaný na makrofázích a cestou aktivace prozánětlivé signální dráhy NF κ B spouští kaskádu dalších zánětlivých reakcí (Sunahori K. et al., 2006). Jeho zvýšené koncentrace byly opakovaně nalezeny v synoviální tekutině pacientů s RA. Vzhledem k tomu, že se jedná o malou molekulu (36,5 kDa), lehce difunduje přes stěny kapilár do cirkulace, kde jej můžeme pohodlně měřit (Dale I. et al., 1983, Berntzen H. B. et al., 1991, Brun J. G. et al., 1994).

Jeho sérové koncentrace korelovaly s aktivitou nemoci, hodnotami C-reaktivního proteinu, sedimentací erytrocytů a titry revmatoidních faktorů (Berntzen H. B. et al.,

1988, Berntzen H. B. et al., 1989, Brun J. G. et al., 1992, Hammer H. B. et al., 2008). Bylo také prokázáno, že vysoké koncentrace calprotectinu na začátku onemocnění predikovaly zvýšené riziko rychlé radiografické progrese (Hammer H. B. et al., 2007, Hammer H. B. et al., 2010). Navíc se ukazuje, že zvýšené hodnoty calprotectinu u pacientů s juvenilní formou artritidy v klinické remisi mohou predikovat riziko relapsu onemocnění (Foell D. et al., 2010, Anink J. et al., 2015).

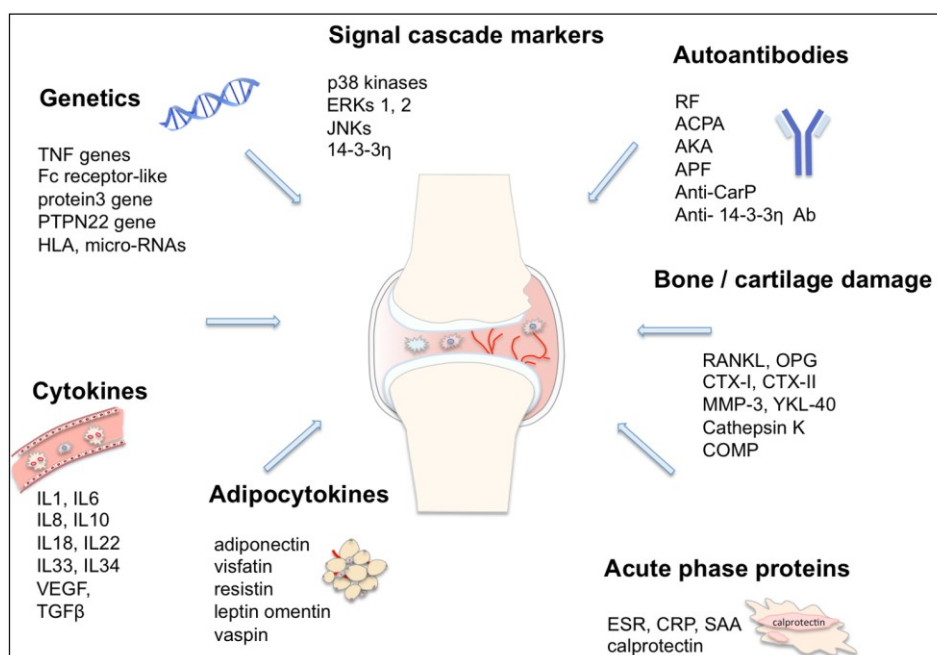
1.2.5. Markery kloubní destrukce

Chrupavka, jak je známo, je tvořená kolagenem, proteoglykany a v minoritním zastoupení také glykoproteiny. Kost sestává z mineralizované kolagenové matrix. Obě tkáně mohou být degradovány různými aktivovanými proteinázami.

Metaloproteinázy jsou enzymy, které se významným způsobem podílejí na destrukci kloubů, zejména na degradaci chrupavky u RA. MMP jsou produkovány ve formě neaktivních proenzymů a uskladněny v specifických granulách neutrofilů a různých buněk pojivové tkáně. K jejich uvolnění dochází zejména vlivem zánětlivých dějů. Metaloproteinázy lze rozdělit do čtyř hlavních skupin: stromeolysiny, kolagenázy, gelatinázy a MT-MMP (membrane-type matrix metalloproteinase). Z klinického hlediska má u revmatoidní artritidy nejdůležitější roli stromeolysin-1 nebo-li metaloproteináza-3 (MMP-3) (Burrage P. S. et al., 2006).

MMP-3 je aktivována lokálně v kloubní synovii vlivem zánětlivých cytokinů jako jsou IL-6, TNF α a IL-1 (Konttinen Y. T. et al., 1999). MMP-3 je enzym schopný degradace části matrix pojivové tkáně jakými jsou proteoglykany, laminin, fibrinektin a kolagen IV (Burrage P. S. et al., 2006). Kromě degradace matrix pojivové tkáně dokáže aktivovat jiné metaloproteinázy, například enzym kolagenázu (MMP-1). Jeho zvýšené koncentrace byly nalezeny v synoviální tekutině i sérech pacientů s RA (Ishiguro N. et al., 1996). V poslední době se objevilo několik protichůdných prací o vztahu MMP-3 a klinické aktivity u RA. Pravděpodobný je ale jeho přímý vliv na erozivní poškození (Mamehara A. et al., 2010, Houseman M. et al., 2012).

Faktory podílející se na patogenezi RA jsou uvedeny na Obr. 1.1.



Obr. 1.1. Faktory podílející se na patogenezi RA.

1.3. Konvenční metody hodnocení aktivity revmatoidní artritidy

K hodnocení aktivity revmatoidní artritidy se běžně používají klinické kompozitní indexy: DAS 28 (Disease activity score – 28 kloubů), DAS 44 (Disease activity score – 44 kloubů), SDAI (Simplified Disease Activity Index) a CDAI (Clinical Disease Activity Index) (Tab. 1.). V Evropě a v České republice je nejvíc rozšířen index DAS 28, který vychází z hodnocení počtu oteklých a palpačně bolestivých kloubů, globálního hodnocení pacienta a zánětlivého parametru (C-reaktivního proteinu nebo rychlosti sedimentace erytrocytů). Jednotlivé komponenty nejčastěji používaných indexů aktivity RA jsou uvedené v Tab. 2. Rozsah aktivity nemoci podle uvedených indexů je uveden v Tab. 3.

Tab. 1. Ukazatele aktivity nemoci a kritéria odpovědi na léčbu.

Indexy aktivity nemoci	DAS 28 (Disease activity score 28 joints) DAS 44 (Disease activity score 44 joints) SDAI (Simplified disease activity index) CDAI (Clinical disease activity index) RADAI (RA disease activity index) Kloubní indexy (Ritchie, ACR)
Kritéria odpovědi na léčbu	EULAR (DAS 28) (European League Against Rheumatism) ACR 20,50,70 (American College of Rheumatology)

Tab. 2. Porovnání kompozitních indexů DAS28, SDAI a CDAI k měření aktivity choroby.

Parametr	DAS28	SDAI	CDAI
počet bolestivých kloubů	+	+	+
počet oteklých kloubů	+	+	+
globální hodnocení pacientem	+	+	+
globální hodnocení lékařem	-	+	+
FW nebo CRP	+	+	-

Tab. 3. Rozsah aktivity choroby podle nejčastěji používaných kompozitních indexů.

Index	Kategorie aktivity choroby			
	Remise	Nízká	Střední	Vysoká
DAS28	< 2.6	2.6–3.2	> 3.2–5.1	> 5.1
SDAI	≤ 3.3	> 3.3–11	> 11–26	> 26
CDAI	≤ 2.8	> 2.8–10	> 10–22	> 22

1.4. Význam muskuloskeletální ultrasonografie v detekci zánětu a hodnocení aktivity revmatoidní artritidy

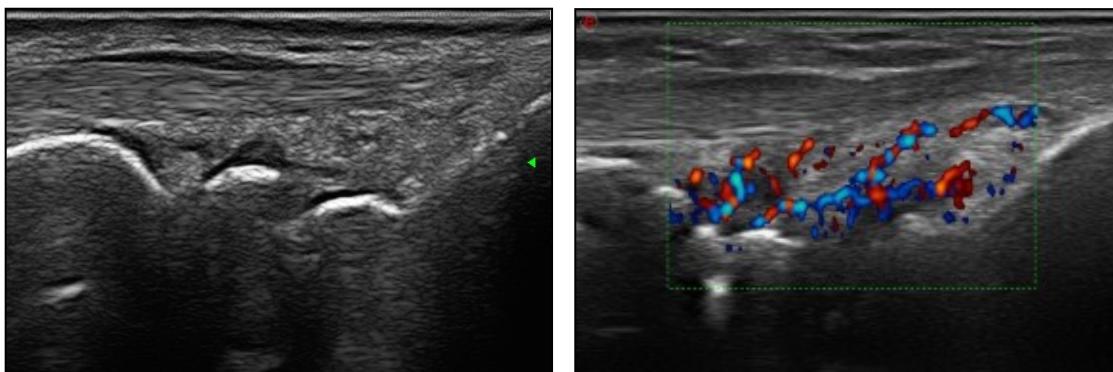
Inovativním přístupem je hodnocení aktivity revmatoidní artritidy pomocí ultrazvukové zobrazovací metody (US). Ultrazvukové vyšetření je etablovanou metodou v různých odvětvích medicíny, nicméně v revmatologii se širšímu uplatnění doznalo až v posledních letech. Zásadní mírou se na tom podílel vývoj vysokofrekvenčních sond (10–22 MHz), které umožnily detailní zobrazení povrchově uložených struktur (Backhaus M. et al., 2001). Pokrok v ultrazvukových metodách tak přispěl k možnosti citlivé detekce a dynamického sledování morfologických obrazů zánětlivých změn při RA.

Ultrazvuková metoda je v současnosti považována za senzitivnější než klinické vyšetření pohybového aparátu. US například umožňuje výrazné zpřesnění a urychlení diagnostiky revmatoidní artritidy (RA), především v jejím časném stádiu, kdy je klinické hodnocení často negativní nebo nejasné (van de Stadt L. A. et al., 2010, Nam J. L. et al., 2016). Cenné využití tohoto vyšetření spočívá nejen ve včasném určení diagnózy, ale má také význam při hodnocení a objektivnějším posouzení aktivity kdykoliv v průběhu choroby (Naredo E. et al., 2007).

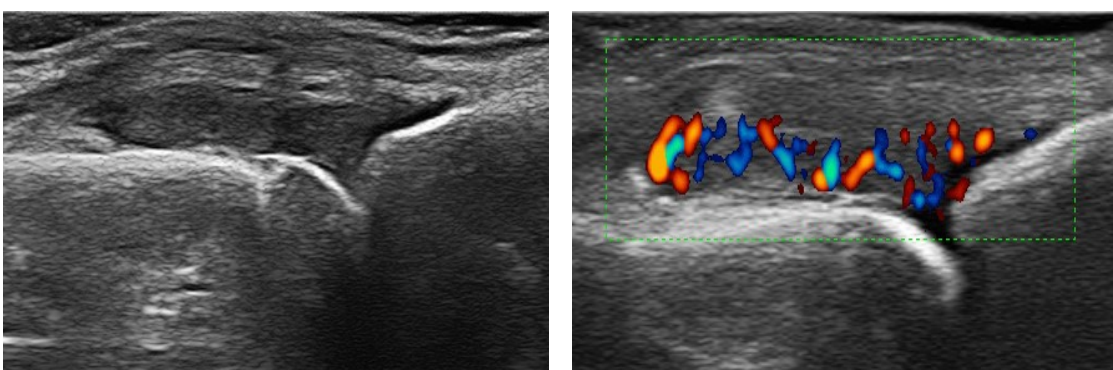
Ultrazvukové vyšetření v revmatologii využívá dvou typů zobrazení, a to metodu GreyScale (GS) a barevné mapování Dopplerem – Power Doppler (PD). Greyscale, neboli zobrazení v odstínech šedi, vzniká na základě intenzity a směru odražených zvukových vln od akusticky rozdílného prostředí. Umožňuje tak morfologickou vizualizaci struktur jako je kost, chrupavka, kloubní pouzdro, kloubní dutina, šlachy, vazy, enteze, nervy. Umožní odlišení zbytnělé synoviální výstelky od výpotku a ostatních příčin imitujících otok kloubu, jako je subkutánní edém či tenosynovitida (Schmidt W. A. and Backhaus M. 2008). Při sonografickém vyšetření kloubu se kromě šedého, resp. černobílého zobrazení významně uplatňuje barevné mapování pomocí PD. Klasické dopplerovské vyšetření využívá změnu frekvence ultrazvukových vln odražených od pohybujících se krevních elementů, což je využíváno především v kardiologii a angiologii. Metoda PD detekuje celkové množství cirkulující krve (bez ohledu na směr a rychlost toku krve), citlivě zobrazí tkáňovou mikrocirkulaci (Schmidt W. A. 2004). Pro zánětlivé procesy je charakteristické zvýšené prokrvení a PD je tak přínosnou metodou v detekci patologické hypervaskularizace a odlišení aktivního zánětu od neaktivní chronicky zbytnělé synovie (Wakefield R. J. et al., 2003, Torp-Pedersen S. et al., 2015). Některé práce navíc dokládají, že ultrazvukem verifikovaná synovitida významně koreluje s histologickou závažností artritidy (Koski J. M. et al., 2006).

Definice ultrazvukových nálezů typických pro RA

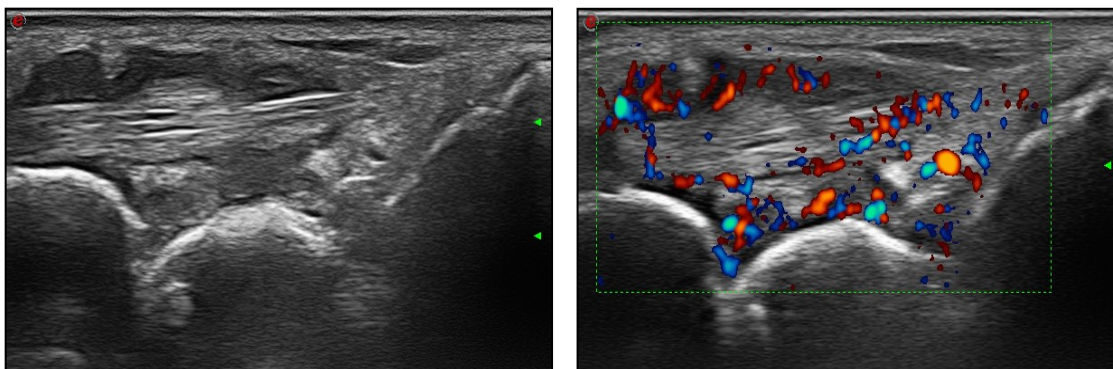
V současnosti se používají definice jednotlivých US nálezů publikovaných skupinou OMERACT (Outcome Measures in Rheumatology). Jako výpotek je charakterizován abnormální hypo- nebo anechogenní intraartikulární obsah, který je možné stlačit až vytlačit. Synoviální hypertrofie je definována jako abnormální hypoechogenní intraartikulární tkáň, která na rozdíl od výpotků, není vytlačitelná a jen špatně stlačitelná a může vykazovat pozitivní dopplerovský signál (Obr. 1.2.-1.4.). Synoviální výstelka v době akutního procesu se zobrazuje víc hypoechogenně, v případě chronických synovialitid více hyperechogenně. Typickým projevem revmatoidní artritidy jsou také tenosynovitidy, které se v ultrazvukovém obraze vizualizují jako hypo- nebo anechogenní ztlustění tkáně s nebo bez přítomnosti tekutiny v šlachové pochvě a mohou vykazovat pozitivní dopplerovský signál (Obr. 1.4., 1.5.).



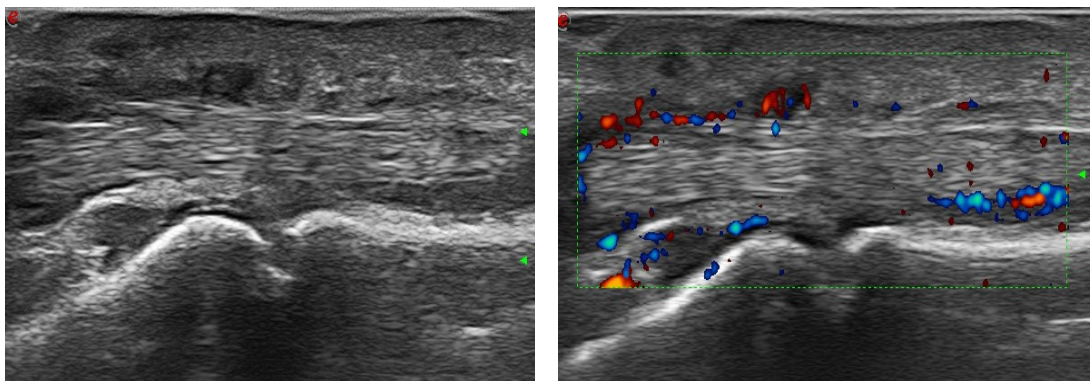
Obr. 1.2. Zápěstní kloub. Vlevo: normální US nález. Vpravo: aktivní artritida zápěstního kloubu - hypertrofická synovie s pozitivním barevným mapováním.



Obr. 1.3. Artritida metacarpofalangeálního skloubení. Vlevo: nález v GS. Vpravo: nález v PD.



Obr. 1.4. Artritida zápěstního kloubu s těžkou tenosynovialitou společně extenzorové šlachy zápěstí. Vlevo: nález v GS. Vpravo: nález v PD.



Obr. 1.5. Aktivní tenosynovialitida flexorové šlachy nad metacarpofalangeálním skloubením: výrazné zduření synovie v pouzdru šlachy s pozitivním barevným mapováním. Vlevo: nález v GS. Vpravo: nález v PD.

2. HYPOTÉZA A CÍLE

Předpokládáme, že některé z moderních biomarkerů lze prokázat v séru pacientů s RA, a že jejich abnormální koncentrace nejsou jenom známkou přítomnosti nemoci, ale také citlivou reflexí probíhajících zánětlivých dějů kdykoliv v průběhu trvání onemocnění. Domníváme se, že monitorování aktivity pomocí některých biomarkerů může být velmi důležité ve vztahu k adjustaci a optimalizaci terapie s cílem zpomalení progresu nemoci a zabránění vzniku ireverzibilních strukturálních změn.

Naší prioritou je posouzení významu moderních sérových biomarkerů ve vztahu k patogenezi zánětlivých dějů u RA a určení jejich významu v pravidelné monitoraci aktivity nemoci vyjádřené konvenčními ukazateli a senzitivní ultrazvukovou metodou.

Cíle práce

1. Prokázat přítomnost vybraných markerů kloubního zánětu (IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-17A, IL-22, IL-33, IL-34, IFN γ , metaloproteináza-3, visfatin, resistin, leptin, adiponektin, chemokin CXCL13, VEGF, VCAM-1, calprotectin, YKL-40) v sérech pacientů s RA, zhodnotit jejich význam ve vztahu k aktivitě RA, určit jejich asociace s konvenčními klinickými a laboratorními ukazateli aktivity nemoci.
2. Určit vztah výše uvedených biomarkerů k aktivitě zánětlivého procesu hodnoceného moderní zobrazovací ultrazvukovou metodou, která citlivěji detekuje zánětlivé změny u RA než tradiční metody využívané k měření aktivity nemoci.
3. Vytvořit komplexní nástroj pro hodnocení aktivity revmatoidní artritidy a/nebo odpovědi na léčbu pomocí analýzy sérových biomarkerů kloubního zánětu.

3. METODIKA A VÝSLEDKY

V období od 09/2011 do 10/2016 bylo do studie zařazeno 260 pacientů s RA léčených v Revmatologickém ústavu v Praze. Všichni zařazení pacienti splnili ACR/EULAR klasifikační kritéria pro RA z roku 1987 nebo 2010 a podepsali informovaný souhlas schválený lokální Etickou komisí (referenční číslo 3560/2010). Pacienti byli vyšetřováni klinicky (počet citlivých a oteklých kloubů), byl vypočítán klinický index aktivity DAS28-FW, DAS28-CRP, SDAI a CDAI). K vyhodnocení kvality života byl použitý standardizovaný dotazník HAQ (Health assessment score).

V den klinického vyšetření byla pacientům odebrána periferní krev k stanovení konvenčních laboratorních ukazatelů (FW, CRP). Sérum bylo získáno centrifugací a vzorky byly následně zamrazeny a skladovány při teplotě -80 °C. K analýze bylo vytypováno 20 moderních sérových markerů aktivity RA: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17A, IL-22, IL-33, IL-34, IFN γ , YKL-40, CXCL13, VCAM-1, VEGF, leptinu, resistinu (hladiny měřeny luminexovou metodou - multi-assays), visfatinu, adiponektinu, MMP-3 a calprotectinu (hladiny měřeny metodou ELISA).

ELISA

Koncentrace visfatinu, adiponektinu, MMP-3 a calprotectinu byly měřeny v kultivačním mediu komerčně dostupných ELISA kitů podle pokynů výrobců. Hladiny calprotectinu byly měřeny pomocí ELISA kitu výrobce Bülmann Laboratories AG, Schönenbuch, Switzerland s detekčním limitem 0.4 μ g/mL, hladiny visfatinu pomocí ELISA kitu výrobce Biovision, Milpitas California, USA s detekčním limitem 0.125 ng/ml, hladiny MMP-3 pomocí ELISA kitu výrobce RayBiotech, Inc., Georgia, USA s detekčním limitem 0.3 ng/ml a hladiny adiponektinu pomocí ELISA kitu výrobce Biovendor, Czech Republic s detekčním limitem 0.47 ng/ml. Absorbance byla měřena pomocí ELISA čtecího zařízení SUNRISE (Tecan, Salzburg, Austria) na vlnové délce 450 nm.

Luminex (multi-assay)

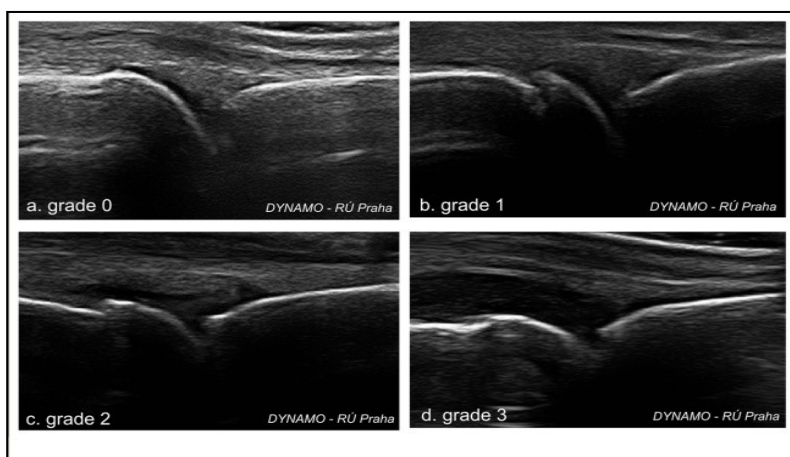
Koncentrace IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17A, IL-22, IL-33, IL-34, IFN γ , YKL-40, CXCL13, VCAM-1, VEGF, leptinu a resistinu byly měřeny použitím Magnetic Luminex Screening Assay multiplex kitu (R&D systems) podle instrukcí výrobců. Data byla získána a analyzována použitím přístroje Luminex MAGPIX (software pro měření a analýzu: Luminex eXPONENT, výrobce přístroje Merck Millipore).

Ultrazvukové vyšetření

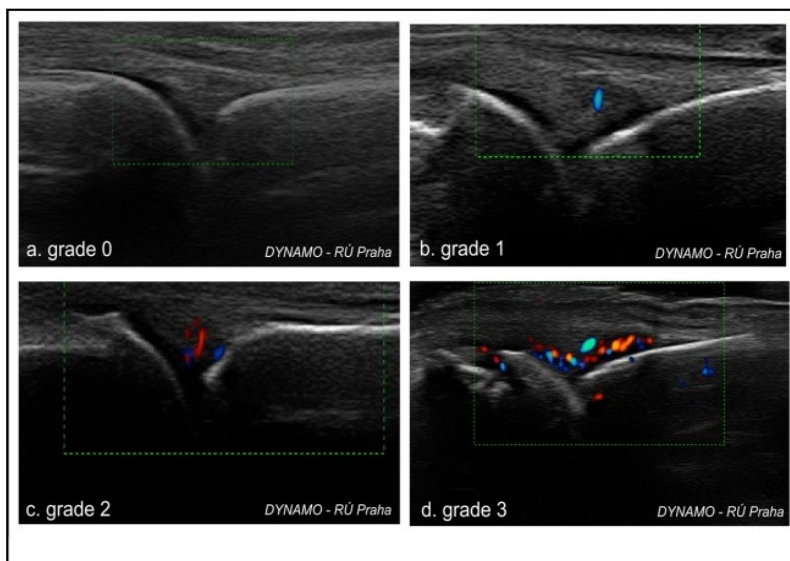
V den klinického vyšetření a odebrání vzorků krve byli pacienti vyšetřeni také sonograficky. Pro projekt byl zvolen ultrazvukový skórovací index (0-3) German US7 hodnotící 7 nejčastěji postižených kloubů (zápěstí, metakarpofalangeální kloub II a III, proximální interfalangeální kloub II, III z dorzální a palmární strany a metatarsofalangeální kloub II a V z dorzální a plantární strany) na dominantně postižené končetině (pravá vs. levá ruka a noha) (Obr. 3.1.) (Backhaus M. et al., 2009). Využívá semi-kvantitativního skórování synoviality v odstínech šedi - GS a pomocí dopplerovského mapování - PD; kde GS 0 = normální nález (žádná elevace kloubního pouzdra), 1 = mírná synovialitida (malá hypoechogenní linie pod kloubním pouzdrem), 2 = středně těžká synovialitida (kloubní pouzdro vyvýšené paralelně s kloubní linií), 3 = těžká synovialitida (významné rozšíření kloubního pouzdra) (Obr. 3.2.). PD 0 = normální nález (žádný intraartikulární barevný signál), 1 = mírná synovialitida (do 3 barevných signálů, resp. 2 samostatné signály a 1 splývající barevný signál), 2 = středně těžká synovialitida (početné barevné signály ($> \text{grade } 1 < 50\%$ intraartikulární plochy je pokrytá barevným signálem), 3 = těžká synovialitida ($> 50\%$ intra-artikulární kloubní plochy je pokryto barevným signálem) (Obr. 3.3.). Posléze bylo vyhodnoceno totální skóre pro jednotlivé US patologie ve všech vyšetřených kloubech. K ultrazvukovému vyšetřování byl použit přístroj Esaote My Lab 60 (Esaote S.p.A., Genova, Italy), vybaven vysokofrekvenčními sondami (12-18 MHz).

	Zápěstí	Ruka	Noha	
Synovitida	dorzálně + PD palmárně + PD ulnárně + PD	MCP II, III palmárně + PD dorzálně jen PD PIP II, III palmárně + PD dorzálně jen PD	MTP III, V dorzálně + PD	
Paratenonitida/ tenosynovitida	dorzálně + PD palmárně + PD ulnárně + PD	MCP II, III dorzálně + PD palmárně + PD		
Eroze		MCP II, III dorzálně, palmárně MCP II radiálně PIP II, III dorzálně, palmárně	MTP II, V dorzálně, palmárně MTP V laterálně	
	1 kloub	4 klouby	2 klouby	
	7 kloubů			

Obr. 3.1. German US7 skórovací index. Upraveno podle (Backhaus M. et al., 2009).



Obr. 3.2. Semi-kvantitativní hodnocení synovialitydy podle GS. Upraveno podle (Backhaus M. et al., 2009).



Obr. 3.3. Semi-kvantitativní hodnocení synovialitydy podle PD. Upraveno podle (Backhaus M. et al., 2009)

Statistické metody

Hladiny vybraných markerů kloubního zánětu a výsledky získané pomocí muskuloskeletálního ultrazvuku za využití vybraného ultrazvukového skórovacího indexu byly statisticky vyhodnoceny ve srovnání s dosud rutinně užívanými metodami k hodnocení zánětlivé aktivity.

Pro všechny proměnné byly spočítány základní deskriptivní statistiky centrální tendence a variability: průměr \pm SD, modus, medián, minimum, maximum. Srovnání proměnných mezi různě definovanými skupinami pacientů bylo provedeno pomocí parametrického t-testu pro srovnání dvou výběrů nebo jednocestné analýzy rozptylu (ANOVA – Analysis of Variance) pro vícenásobná srovnání. Neparametrické varianty těchto testů (tedy Mann-Whitney U test, resp. Kruskal–Wallis test) byly využity v případě, kdy normalita nebyla vzhledem k extrémní asymetrii rozložení prokázána (např. hodnoty CRP).

Multivariantní analýza byla použita k odhadu určitých závislých (vysvětlovaných) proměnných na základě vybraných nezávislých proměnných (tzv. kovariátů anebo vysvětlujících proměnných). ROC křivky (receiver operating characteristic curves) a AUC plochy (area under the curve) byly využívány k posouzení vypovídající schopnosti určitého diagnostického testu v závislosti na jeho senzitivě a specifitě.

Hodnoty $p < 0.05$ byly považovány za statisticky významné. Analýzy byly provedeny pomocí softwaru SPSS (verze 17 nebo 23, SPSS, Inc., Chicago, USA). Konkrétní statistická zpracování jsou blíže uvedena v jednotlivých publikacích, případně v rámci konkrétní podkapitoly rozebírající danou problematiku.

3.1. Asociace mezi ultrazvukovým skóre US7 a parametry kvality života a fyzické funkce (komentář k publikaci zařazené do disertační práce)

Řada autorů prokázala úzký vztah ultrazvukových parametrů synoviality s konvenčními klinickými a laboratorními ukazateli aktivity RA. Dosud nebyl studován vztah ultrazvukového skóre US7 s parametry kvality života. Cílem této studie bylo prozkoumat longitudinální vztah mezi parametry US-7 skóre a fyzické funkce v prospektivní kohortě pacientů s RA. Zjistili jsme, že ultrazvukové parametry

synovialitidy i tenosynovialitidy hodnocené škálou stupně šedi (GS) i pomocí dopplerovského mapování (PD) jsou asociovány s kvalitou života vyjádřenou pomocí modifikovaného HAQ (mHAQ) dotazníku. Asociace byla významnější u pacientů s časnou RA, než u pacientů s etablovanou artritidou. Ve vícerozměrném modelu (zahrnujícím věk, pohlaví, BMI, RF/ACPA pozitivitu a DAS28) již jednotlivá US subskóre synovialitidy a tenosynovialitidy nebyla s mHAQ statisticky významně asociována, ale v souhrnu mírně zlepšovala výpovědní hodnotu daného modelu.

Publikace k tématu:

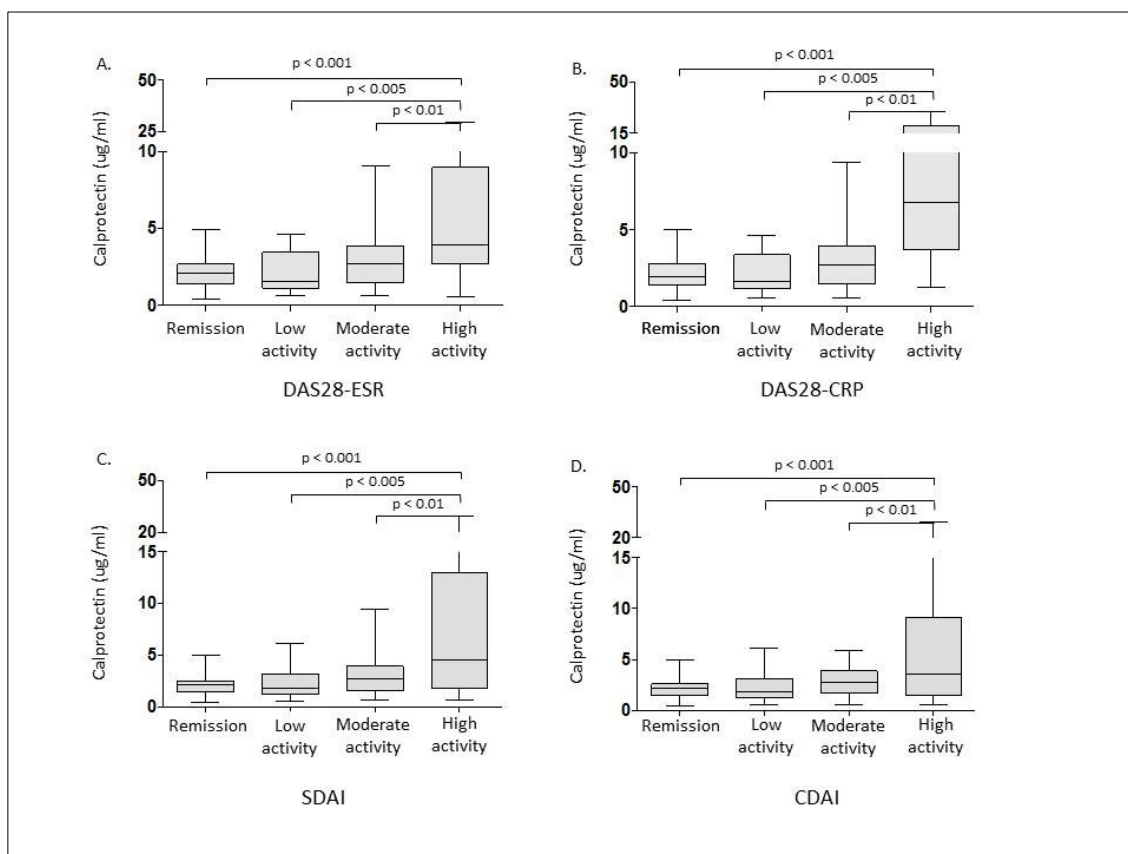
Zavada J, Hanova P, Hurnakova J, Szczukova L, Uher M, Forejtova S, Klein M, Mann H, Olejarova M, Ruzickova O, Sleglova O, Hejduk K, Pavelka K. The relationship between synovitis quantified by an ultrasound 7-joint inflammation score and physical disability in rheumatoid arthritis – a cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2017; 19: 5.

3.2. Vztah sérového calprotectinu k aktivitě revmatoidní artritidy (komentáře k publikacím zařazeným do disertační práce)

3.2.1. Hladiny sérového calprotectinu korelují s aktivitou revmatoidní artritidy a jsou nezávislým prediktorem ultrazvukové synovitidy

V další části projektu jsme se intenzivně věnovali výzkumu sérového calprotectinu (heterodimer S100A8/9, MRP8/14, calgranulin A a B), který patří mezi slibné markery aktivity RA. Na rozdíl od jiných sérových proteinů akutní fáze, které jsou většinou hepatálního původu, je calprotectin uvolňován z aktivovaných synoviálních makrofágů během zánětlivých procesů, a tak přímo odráží lokální zánětlivou aktivitu v kloubech. Jeho zvýšené hladiny byly pozorovány nejen v synoviální tekutině, ale i v periferní krvi pacientů. Cílem naší studie bylo zjistit, jestli hladiny calprotectinu korelují s tradičními parametry aktivity nemoci a navíc, jestli korelují také s ultrazvukovou aktivitou synovitidy, která je považována za citlivější nástroj hodnocení aktivity než klinické hodnocení. Dále jsme se pokusili definovat prediktivní hodnotu jednotlivých sledovaných parametrů ve vztahu k ultrazvukem definované aktivitě choroby.

Naše výsledky prokázaly, že hladiny sérového calprotectinu významně korelují s klinickými, tradičními laboratorními a navíc ultrazvukovými parametry aktivity RA (Obr. 3.4.). Za nejdůležitější považujeme právě vztah mezi calprotectinem a PD, který detekuje patologickou neovaskularizaci synoviální tkáně, tudíž přímo reflektuje aktivně probíhající zánět (Tab. 4.). Využitím multivariantní analýzy jsme odhalili, že calprotectin na rozdíl od CRP je nezávislým prediktorem aktivity určené podle indexu CDAI (Tab. 5., 6.). Regresní multivariantní analýza dále prokázala, že oba sérové markery, calprotectin i CRP, predikují aktivní ultrazvukovou synovitidu určenou podle PD, přičemž calprotectin byl významnějším ukazatelem ultrazvukové aktivity než CRP (Tab. 7., 8.).



Obr. 3.4. Box ploty zobrazující vztah calprotectinu k aktivitě RA vyjádřené různými kompozitními indexy.

Tab. 4. Vzájemné průřezové korelace calprotectinu s klinickými, laboratorními a ultrazvukovými parametry aktivity RA.

Parametr	CRP	FW	DAS28-CRP	DAS28-FW	SDAI	CDAI	GS syn	PD syn
Calprotectin	0.556**	0.38**	0.346**	0.321**	0.318**	0.279**	0.379**	0.419**
CRP		0.624**	0.465**	0.418**	0.364**	0.309**	0.373**	0.386**
FW			0.420**	0.611**	0.397**	0.355**	0.291*	0.272**
DAS28-CRP				0.951**	0.969**	0.960**	0.549**	0.515**
DAS28-FW					0.942**	0.928**	0.520**	0.484**
SDAI						0.996**	0.571**	0.499**
CDAI							0.548**	0.490**
GS syn								0.661**
PD syn								
** Korelace je signifikantní ≤ 0.01								
* Korelace je signifikantní ≤ 0.05								
CDAI, Clinical Disease Activity Index; CRP, C-reaktivní protein; DAS28-CRP, Disease Activity Score pro 28 kloubů s C-reaktivním proteinem; DAS28-FW, Disease Activity Score pro 28 kloubů se sedimentací; FW, rychlost sedimentace erytrocytů; GS syn skóre, Skóre synovitidy dle Grey Scale; PD syn score, Skóre synovitidy dle PD; SDAI, Simplified Disease Activity Index;								

Tab. 5. Multivariantní regresní analýza s využitím calprotectinu v predikci klinické aktivity podle CDAI.

Model	R ² = 0.677, adjusted R ² =0.661	Unstandardized Coefficients	Standardized Coefficients	95% Confidence Interval		Significance
		β	β	Lower Bound	Upper Bound	
(Constant)		4.239		-0.588	9.065	0.085
Calprotectin		0.000	0.176	0.000	0.001	0.007
SJC		2.358	0.731	1.977	2.740	0.000
Gender			-0.083	-5.510	0.819	0.145
Age		0.028	0.034	-0.059	0.114	0.531
Disease duration		-0.008	-0.050	-0.027	0.010	0.363
RF		-0.009	-0.085	-0,022	0.004	0.169
Dependent Variable: CDAI						
CDAI, Clinical Disease Activity Index; CRP, C-reactive protein; RF, Rheumatoid factor; SJC, swollen joint count.						

Tab. 6. Multivariantní regresní analýza s využitím CRP v predikci klinické aktivity podle CDAI.

Model	R ² = 0.672, adjusted R ² =0.655	Unstandardized Coefficients	Standardized Coefficients	95% Confidence Interval		Significance
		β	β	Lower Bound	Upper Bound	
(Constant)		6.037		1.071	11.003	0.018
CRP		0.061	0.092	-0.029	0.152	0.182
SJC		2.446	0.755	2.017	2.875	0.000
Gender		2.446	-0.092	-5.826	0.629	0.114
Age		0.009	0,011	-0.082	0.100	0.845
Disease duration		-0.010	-0.062	-0.029	0.008	0.270
RF		-0.005	-0.043	-0.017	0.008	0.473
Dependent Variable: CDAI						
CDAI, Clinical Disease Activity Index; CRP, C-reactive protein; RF, Rheumatoid factor; SJC, swollen joint count.						

Tab. 7. Multivariantní regresní analýza s využitím calprotectinu v predikci PD synovialitidy.

Model	R ² = 0.490, adjusted R ² =0.465	Unstandardized Coefficients	Standardized Coefficients	95% Confidence Interval		Significance
		β	β	Lower Bound	Upper Bound	
(Constant)		1.052		-0.916	3.021	0.292
Calprotectin		0.000	0,499	0.000	0.001	0.000
SJC		0.392	0.374	0.237	0.548	0.000
Gender		1.284	0.140	0.000	2.574	0.051
Age		-0.018	-0.069	-0.054	0.017	0.308
Disease duration		0.003	0.064	0.004	0.011	0.357
RF		0.004	-0.127	0.010	0.001	0.103
Dependent Variable: PD syn score						
CRP, C-reactive protein; PD syn score, Power Doppler synovitis score; RF, Rheumatoid factor; SJC, swollen joint count.						

Tab. 8. Multivariantní regresní analýza s využitím CRP v predikci PD synoviality.

Model	R ² = 0.414 adjusted R ² =0.385	Unstandardized Coefficients	Standardized Coefficients	95% Confidence Interval		Significance
		β	β	Lower Bound	Upper Bound	
(Constant)		2,38		0.229	4.531	0.030
CRP		0.176	0.349	0.036	0.114	0.000
SJC		0.410	0.390	0.224	0.596	0.000
Gender		1.113	0,121	-0.285	2.511	0.128
Age		0.300	-0.111	-0.069	0.009	0.134
Disease duration		0.002	0.037	-0.006	0.010	0.622
RF		0.001	-0.026	-0.006	0.005	0.745
Dependent Variable: PD syn score						
CRP, C-reactive protein; PD syn score, Power Doppler synovitis score; RF, Rheumatoid factor; SJC, swollen joint count.						

Publikace k tématu:

Hurnakova J, Zavada J, Hanova P, Hulejova H, Klein M, Mann H, Sleglova O, Olejarova M, Forejtova S, Ruzickova O, Komarc M, Pavelka K, Senolt L. Serum calprotectin (S100A8/9) is an independent predictor of ultrasound synovitis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2015; 17:252.

Hurnakova J, Hulejova H, Zavada J, Hanova P, Komarc M, Mann H, Klein M, Sleglova O, Olejarova M, Forejtova S, Ruzickova O, Vencovsky J, Pavelka K, Senolt L. Relationship between serum calprotectin (S100A8/9) and clinical, laboratory and ultrasound parameters of disease activity in rheumatoid arthritis: A large cohort study. *PLoS One*. 2017 Aug 23;12(8).

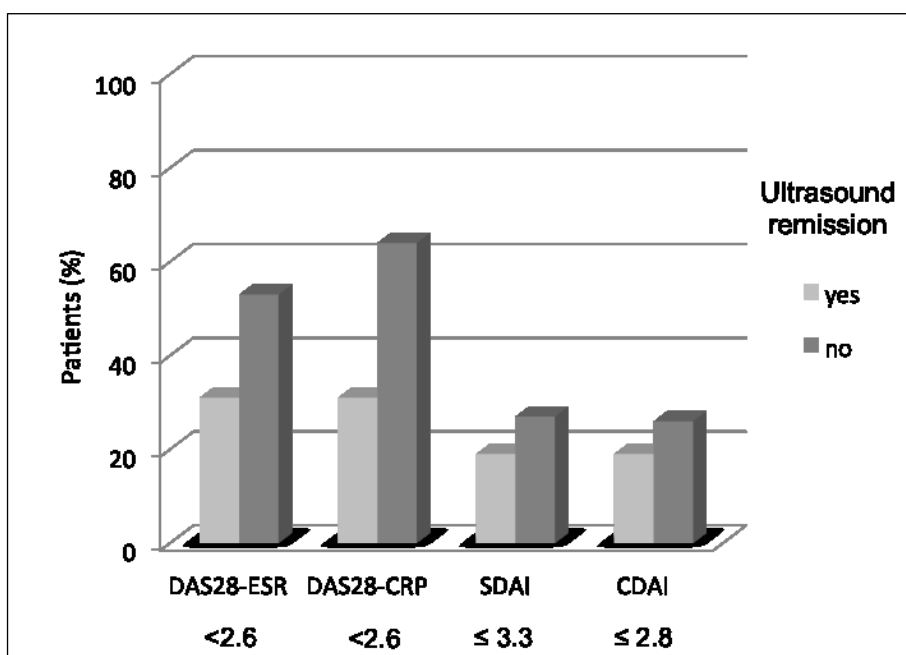
3.2.2. Význam stanovování sérového calprotectinu u pacientů s revmatoidní artritidou v klinické remisi

Cílem tohoto projektu bylo analyzovat hladiny sérového calprotectinu v podskupině pacientů v klinické remisi a zjistit, jestli calprotectin dokáže odlišit nemocné v

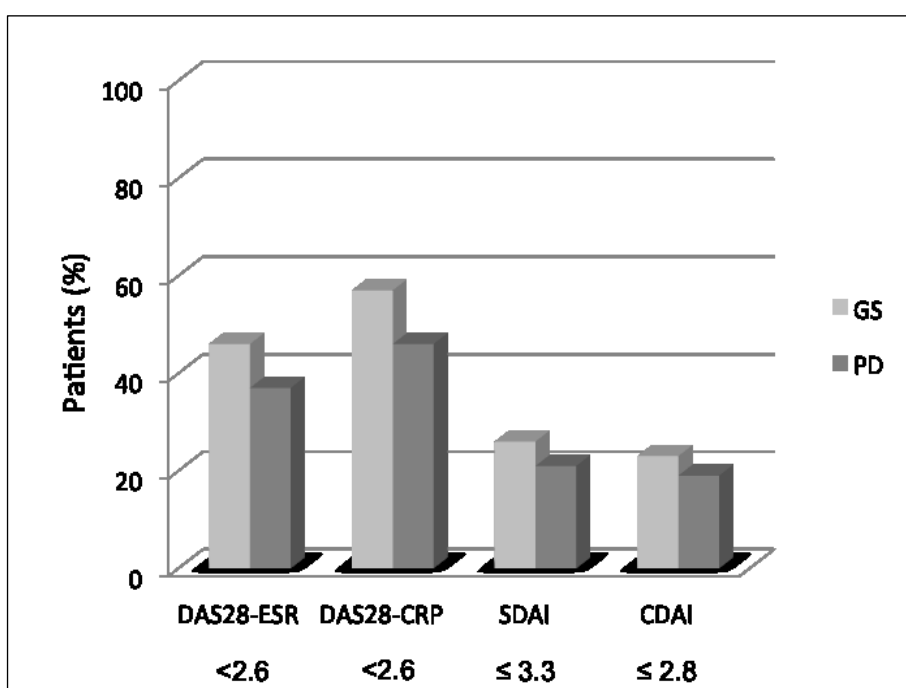
ultrazvukem verifikované remisi od pacientů, u kterých nadále přetrvává reziduální kloubní sonografická aktivita. Subanalýzu jsme provedli na 70 pacientech (Tab. 9.), u kterých jsme zjistili, že přes zdánlivé dosažení remise probíhá až u 58-67 % nadále subklinický zánět detekovaný senzitivní ultrazvukovou metodou (Obr. 3.5.,3.6.). Právě perzistující reziduální aktivitou lze vysvětlit pokračující strukturální progresi u části pacientů bez klinicky zjevných artritid. Nesmírně důležitým zjištěním bylo také to, že u pacientů s přetrvávající reziduální US aktivitou jsou hladiny sérového calprotectinu zvýšené oproti pacientům v ultrazvukové remisi (Obr. 3.7.). Využitím ROC křivek jsme prokázali, že sérový calprotectin, na rozdíl od konvenčně používaného C-reaktivního proteinu, dokáže lépe rozlišit ty pacienty, u kterých byla hluboká remise potvrzena sonograficky od nemocných, u kterých nadále přetrvávala subklinická aktivita detekovaná citlivou zobrazovací metodou (Obr. 3.8.).

Tab. 9. Charakteristika pacientů s RA v klinické remisi.

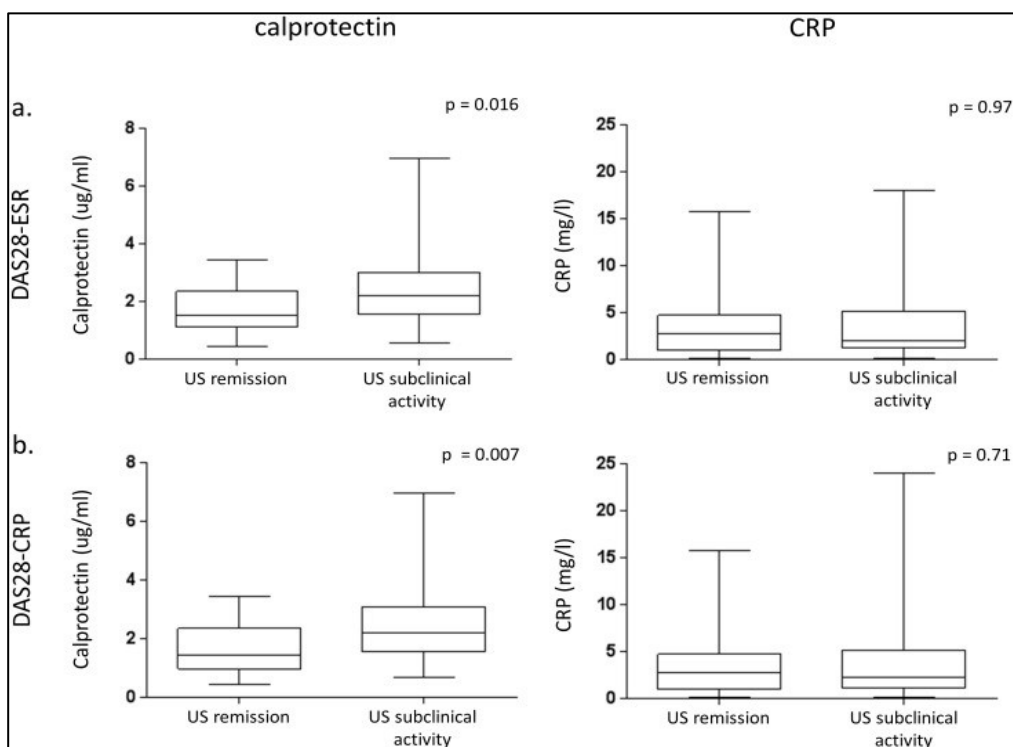
Pacienti s RA (n = 70)		
Ženy (%)	51	(73%)
Věk (roky)	6 ± 0,9	
Pozitivita RF, n (%)	42	(60%)
Pozitivita anti-CCP, n (%)	44	(63%)
Calprotectin, ug/ml (průměr)	2.1 ± 1.2	
CRP, mg/l (průměr)	3.8 ± 19	
FW, mm/1. hodina (průměr)	13 ± 19	
DAS28-FW remise, n (%)	59/70	(84%)
DAS28-CRP remise, n (%)	67/70	(96%)
SDAI remise, n (%)	32/70	(45%)
CDAI remise, n (%)	31/70	(44%)
Anti-CCP, protilátky proti cyklickému citrulinovanému peptidu; CDAI, Clinical Disease Activity Index; CRP, C-reaktivní protein; DAS28-CRP, Disease Activity Score pro 28 kloubů s C-reaktivním proteinem; DAS28-FW, Disease Activity Score pro 28 kloubů se sedimentací; FW, rychlost sedimentace erytrocytů; RF, revmatoidní faktor; SDAI, Simplified Disease Activity Index.		



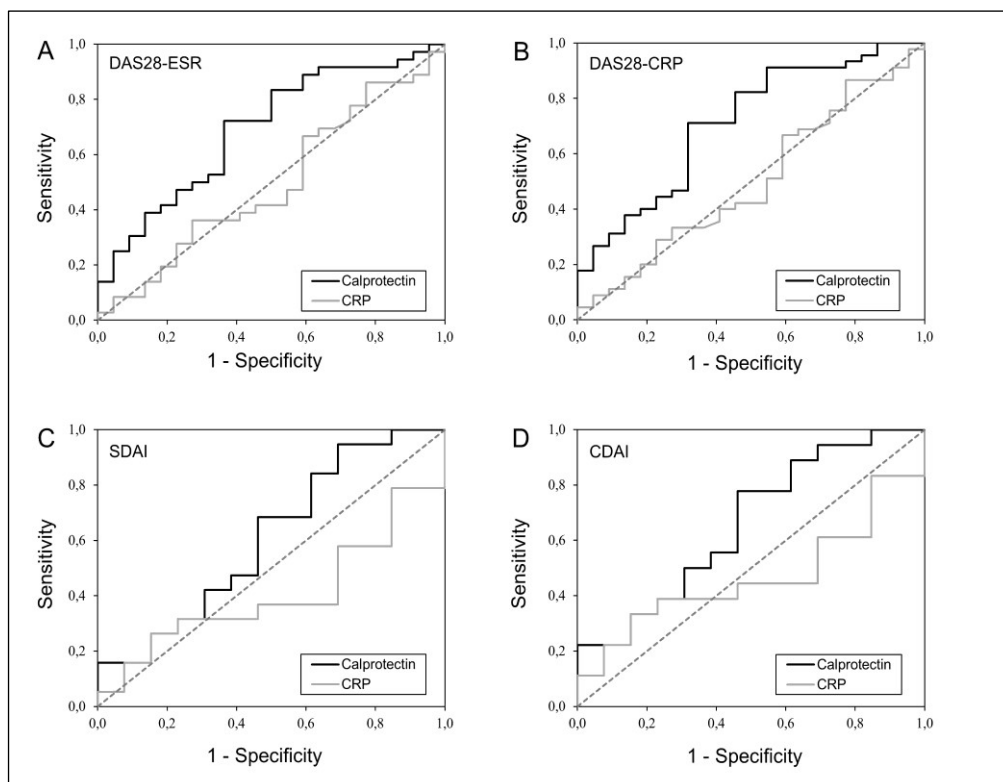
Obr. 3.5. Nález ultrazvukové remisie vs. subklinické aktivity u pacientů s RA v klinické remisi podle různých kompozitních indexů.



Obr. 3.6. Jednotlivé ultrazvukové nálezy u pacientů v klinické remisi podle různých kompozitních indexů.



Obr. 3.7. Box-ploty zobrazující hladiny sérového calprotectinu a CRP u pacientů v klinické remisi podle a) DAS28-ESR a b) DAS28-CRP.



Obr. 3.8. ROC křivky zobrazující schopnost calprotectinu a CRP rozlišit pacienty v ultrazvukové remisi od pacientů s reziduální aktivitou dle US.

Publikace k tématu:

Hurnakova J, Hulejova H, Zavada J, Hanova P, Klein M, Mann H, Sleglova O, Olejarova M, Forejtova S, Ruzickova O, Komarc M, Pavelka K, Senolt L. Serum calprotectin discriminates subclinical disease activity from ultrasound-defined remission in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission, PLoS One. 2016;11(11):e0165498.

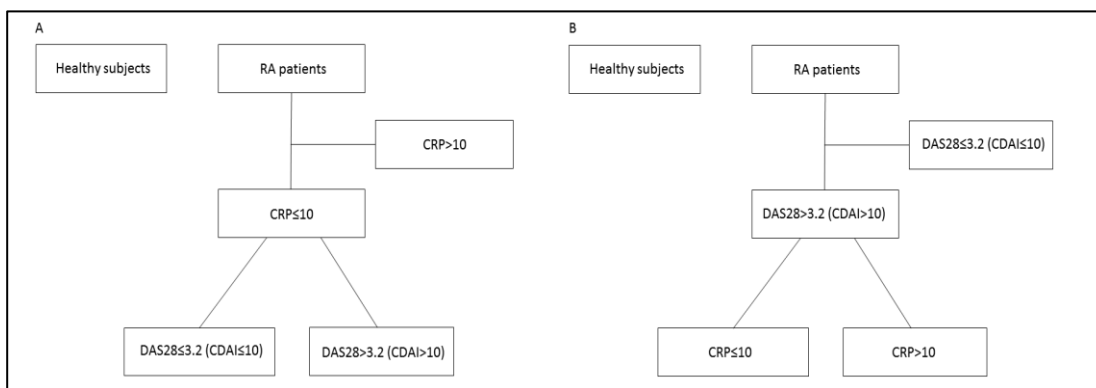
3.2.3. Význam stanovování sérového calprotectinu u části pacientů s klinicky aktivní revmatoidní artritidou při normálních/nízkých hladinách C-reaktivního proteinu

Je známo, že u části pacientů s klinicky aktivní RA nedochází k adekvátní elevaci běžně stanovovaných zánětlivých parametrů. Některé práce dokonce poukázaly na fakt, že až 35-40% pacientů s RA má normální koncentrace reaktantů akutní fáze, což značným způsobem znesnadňuje správné komplexní hodnocení aktivity nemoci. Proto jsme si v další části projektu dali za cíl objasnit, zda sérový calprotectin dokáže identifikovat pacienty s klinicky aktivní nemocí při normálních/nízkých hladinách CRP.

Metodika

Pacienti

Do studie bylo celkově zařazeno 160 pacientů s RA. Všichni pacienti podstoupili klinické hodnocení, byl zaznamenán počet oteklých a bolestivých kloubů a zpočítán index aktivity DAS28 (< 2.6 remise, 2.6 - 3.2 nízká aktivita, > 3.2 - 5.1 střední aktivita, > 5.1 vysoká aktivita) a CDAI (\leq 2.8 remise, > 2.8 – 10 nízká aktivita, >10 – 22 střední aktivita, > 22 vysoká aktivita). Za normální/nízké koncentrace CRP byly považovány hodnoty \leq 10 mg/L. Metodologicky byli pacienti rozděleni do skupin podle koncentrace CRP (cut-off 10 mg/L) a dle klinické aktivity (obr. 3.9.). Kontrolní skupinu tvořilo 32 zdravých jedinců.



Obr. 3.9. Modelový diagram selekce pacientů. Pacienti byli metodologicky vybírání primárně podle hladin CRP (A) nebo primárně podle klinické aktivity (B).

Stanovování sérového calprotectinu, CRP a FW

Základní metodika vyšetřování a stanovování sérového calprotectinu, CRP a FW byla uvedena výše v úvodu kapitoly.

Statistická analýza

T-test byl použit pro srovnání 2 parametrických (normálně rozložených) proměnných, Mann-Whitney U test byl uplatněn pro porovnání rozdílů mezi 2 non-parametrickými proměnnými. ROC křivky (receiver operating characteristic curves) a AUC plochy (area under the curve) byly použity k určení schopnosti calprotectinu rozlišit: a. pacienty s normálním/nízkým CRP a střední až vysokou aktivitou od zdravých jedinců, b. pacienty (s normálním/nízkým CRP) s remisí nebo nízkou aktivitou od těch se střední nebo vysokou aktivitou a dále c. k rozlišení pacientů (se střední až vysokou aktivitou) s normálním/nízkým CRP od těch se zvýšenými hladinami CRP. Byl určen nejvhodnější cut-off určující senzitivitu a specifitu a vypočítáno procento správně klasifikovaných pacientů pomocí daného cut-offu.

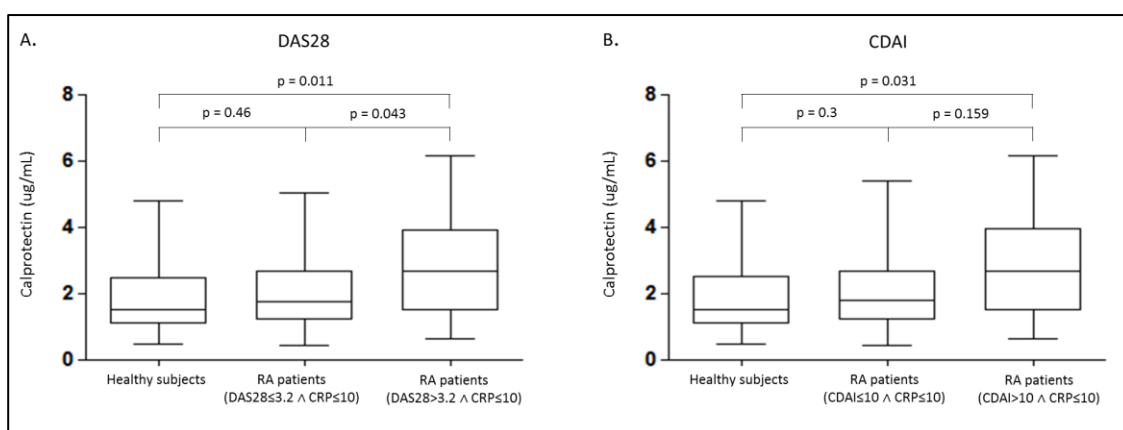
Výsledky

Koncentrace sérového calprotectinu u pacientů s normálními/ nízkými hladinami CRP

V studované kohortě pacientů mělo 51/160 (32%) nemocných normální/nízké hladiny CRP (do 10 mg/l) přes detekovanou střední až vysokou klinickou aktivitu podle DAS28. U této skupiny pacientů bylo možné detekovat signifikantně vyšší koncentrace

calprotectinu ve srovnání s pacienty s normálními/nízkými hladinami CRP, kteří byli v remisi nebo měli nízkou klinickou aktivitu (2.7 ± 1.5 vs. 2.1 ± 1.2 $\mu\text{g/mL}$, $p=0.043$), a rovněž ve srovnání se zdravou kontrolní populací (2.7 ± 1.5 vs. 1.9 ± 1.2 $\mu\text{g/mL}$, $p=0.011$) (Obr. 3.10.).

Koncentrace sérového calprotectinu u pacientů se střední/vysokou klinickou aktivitou



Obr. 3.10. Box-ploty zobrazující sérové koncentrace calprotectinu u zdravých jedinců a pacientů s RA. Koncentrace calprotectinu u zdravých jedinců a pacientů s RA s normálními/nízkými hladinami CRP v remisi nebo s nízkou aktivitou a u pacientů s RA s normálními/nízkými hladinami CRP se střední nebo vysokou aktivitou podle DAS28 (A) a CDAI (B).

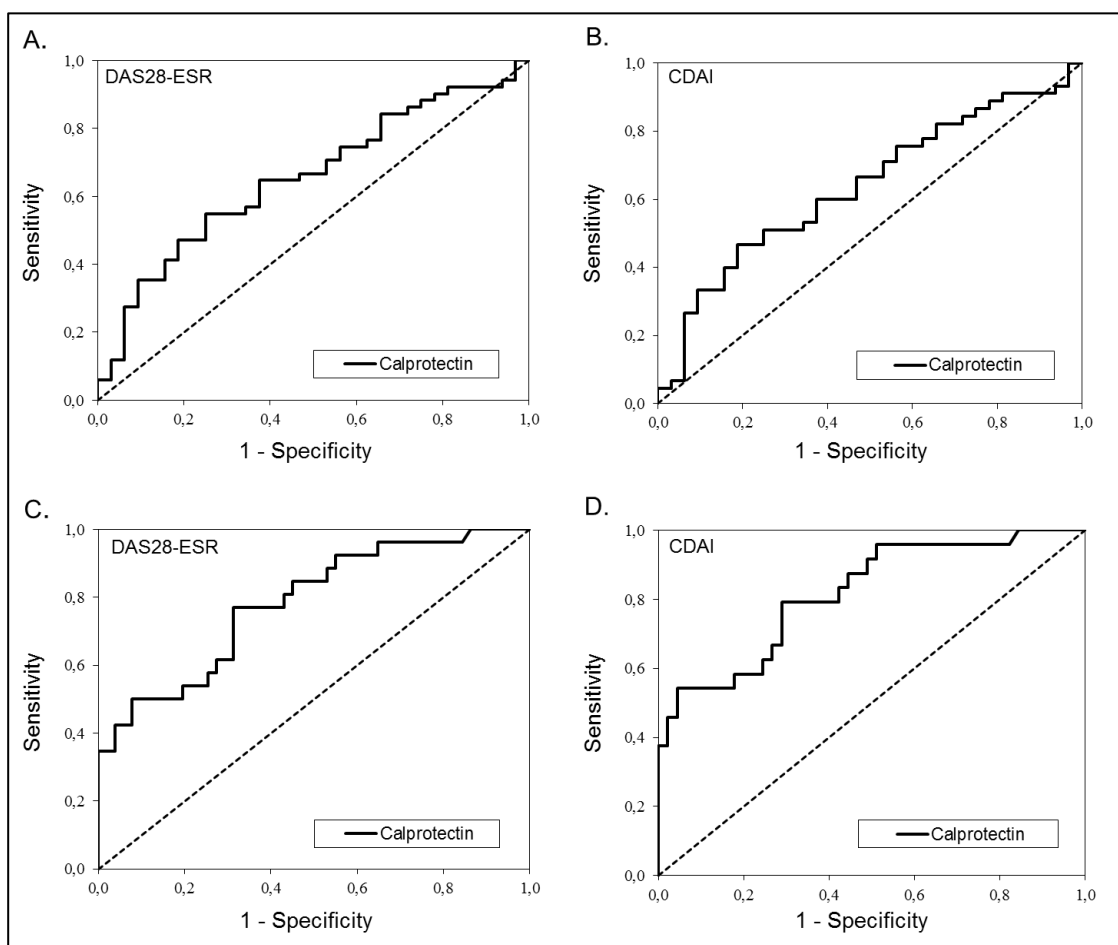
Schopnost calprotectinu rozlišit pacienty s normálními/nízkými koncentracemi CRP při střední/vysoké klinické aktivitě

V této studii jsme použili tři různé modely pro analýzu pomocí ROC křivek ve snaze identifikovat pacienty s normálními/nízkými koncentracemi CRP přes střední/vysokou klinickou aktivitu. V prvním modelu jsme se pokusili zjistit, zda calprotectin dokáže odlišit výše definovanou skupinu pacientů s RA od zdravé populace. Naše výsledky prokázaly dobrou diskriminační schopnost calprotectinu v případě odlišení pacientů se střední/vysokou aktivitou dle DAS28 (AUC of 0.654 (95% CI 0.535 to 0.773, $p=0.019$) s cut-offem 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (senzitivita 55%, specifická 75%). Calprotectin správně identifikoval klinicky aktivní pacienty s RA s normálním/nízkým CRP od zdravých jedinců v 63%. Hodnota AUC pro hladiny calprotectinu v případě pacientů

se střední/vysokou klinickou aktivitou definovanou dle CDAI skóre, bylo 0.638 (95% CI 0.513 to 0.762, $p=0.041$) s cut-offem koncentrace calprotectinu 2.7 $\mu\text{g/mL}$ (senzitivita 47%, specificita 81%). Calprotectin v tomto případě správně identifikoval klinicky aktivní pacienty s normálními/nízkými koncentracemi CRP od zdravých kontrol v 61% případech (Obr. 3.11.).

V druhém modelu jsme testovali diskriminační schopnost calprotectinu rozlišit pacienty s normálními/nízkými koncentracemi CRP a remisí/nízkou aktivitou nemoci od pacientů s normálními/nízkými koncentracemi CRP a zároveň střední/vysokou klinickou aktivitou. Rovněž tento model prokázal dobrou rozlišovací schopnost u pacientů s různou aktivitou podle DAS28 (AUC of 0.607 (95% CI 0.503 to 0.711, $p=0.043$). Nejvhodnější cut-off pro calprotectin byl určen na 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (senzitivita 0.549%, specificita 0.689%), prakticky jako v prvním modelu. Calprotectin zde správně klasifikoval pacienty s RA s normální/nízkou koncentrací CRP bez ohledu na klinickou aktivitu v 63.2% pacientů. Hodnota AUC pro koncentrace calprotectinu v případě pacientů se střední/vysokou klinickou aktivitou definovanou dle CDAI skóre nedosáhla statisticky významných hodnot (AUC=0.576 (95% CI 0.467 to 0.685, $p=0.159$).

Třetí model měl za cíl objasnit, zda calprotectin umožňuje odlišit klinicky aktivní pacienty (se střední/vysokou klinickou aktivitou) s normálními/nízkými hladinami CRP ($\leq 10 \text{ mg/L}$) od těch se zvýšenou hladinou CRP ($>10 \text{ mg/L}$). Analýza prokázala signifikantní schopnost calprotectinu odlišit tyto dvě skupiny charakterizované pomocí DAS28 (AUC = 0.782 (95% CI 0.673 to 0.890, $p<0.001$) s cut-offem 3.2 $\mu\text{g/mL}$ (senzitivita 77%, specificity 69%). Calprotectin správně identifikoval klinicky aktivní pacienty bez rozdílu na normální/abnormální koncentrace CRP v 71%. AUC pro calprotectin u pacientů s aktivní nemocí definovanou podle CDAI skóre dosáhlo nejlepších hodnot (AUC = 0.817 (95% CI 0.712 to 0.923, $p<0.001$) s cut-offem calprotectinu 3.2 $\mu\text{g/mL}$ (senzitivita 79%, specificita 71%). Calprotectin v tomto konkrétním modelu správně určil klinicky aktivní pacienty s RA bez rozdílu na naměřené koncentrace CRP v 74% (Obr. 3.11.).



Obr. 3.11. ROC křivky zobrazující schopnost calprotectinu rozlišit pacienty s klinicky aktivní RA podle DAS28-ESR (A) a CDAI (B) s normálními/nízkými hladinami CRP od zdravých jedinců a od klinicky aktivních pacientů s RA podle DAS28-ESR (C) and CDAI (D) se zvýšenými hladinami CRP.

Publikace k tématu:

Hurnakova J, Hulejova H, Zavada J, Komarc M, Andres Cerezo L, Mann H, Vencovsky J, Pavelka K, Senolt L. Serum calprotectin may reflect inflammatory activity in patients with active rheumatoid arthritis despite normal to low C-reactive protein. *submitováno do Clinical Rheumatology*.

3.3. Vztah dalších moderních markerů kloubního zánětu k aktivitě revmatoidní artritidy. Vytvoření komplexního modelu sérových biomarkerů reflektující zánětlivou aktivitu revmatoidní artritidy

V současnosti jsou intenzivně zkoumány různé jiné biomarkery – cytokiny, růstové faktory, chemokiny; které by reflektovaly celkovou zánětlivou aktivitu RA a umožnily by lépe predikovat strukturální progresi a prognózu pacientů.

Metodika

V naší studii jsme se zaměřili na analýzu a studium 20 sérových markerů kloubního zánětu ve vztahu k aktivitě RA. Celkově bylo vyšetřeno 82 pacientů, z nichž 26 mělo časnou a 56 etablovanou formu onemocnění. Stran aktivity onemocnění bylo rozložení souboru homogenní, a to v poměru 1:1:1:1 pro remisi (n=20), nízkou aktivitu (n=21), střední aktivitu (n=21) a vysokou aktivitu (n=20) dle kritérií indexu DAS28-FW.

Analyzovány byly koncentrace IL-1 β , IL-6, IL-8/CXCL8, IL-12p70, IL-17A, IL-22, IL-33, IL-34, IFN γ , MMP-3, YKL-40, CXCL13, VCAM-1, VEGF, leptinu, resistinu, visfatinu, adiponektinu, calprotectinu a CRP. Stručně byla metodika měření vytipovaných markerů kloubního zánětu popsána v úvodu kapitoly.

Statistická analýza

a. Korelační analýza sérových markerů s klinickými, laboratorními a ultrazvukovými parametry aktivity RA

Byla provedena detailní korelační analýza všech měřených markerů kloubního zánětu s využitím Spearmanova korelačního koeficientu. Hodnoty $p < 0.05$ byly považovány za statisticky významné. Analýzy byly provedeny pomocí softwaru SPSS (verze 23, SPSS, Inc., Chicago, USA).

b. Vytvoření nástroje hodnocení aktivity RA na základě analýzy sérových biomarkerů

Korelační matice 20 markerů kloubního zánětu byla analyzována pomocí explorativní

a konfirmativní faktorové analýzy (EFA, resp. CFA) za účelem nalezení skupiny markerů, které statisticky „patří k sobě“, tj. za kterými stojí společný faktor (konstrukt nebo latentní proměnná). Strukturální modelování (structural equation modeling – SEM) bylo následně použito k ověření, zdali je identifikovaný latentní faktor (v této práci nazvaný jako „*molecular disease activity*“) schopen reflektovat aktivitu onemocnění RA. Pro predikci jsme využili různé definice aktivity onemocnění, a to konkrétně aktivitu vyjádřenou jako:

a. DAS28-FW

b. CDAI

c. GS syn a PD syn

d. PD syn

e. společně vyjádřenou aktivitu:

- e1. faktor aktivity složený ze: DAS28 + GS syn + PD syn

- e2. faktor aktivity složený ze: SJC + GS syn + PD syn

- e3. faktor aktivity složený ze: GS syn + PD syn + CDAI

Pro výpočet parametrů modelů byla využita metoda robustního maximálně věrohodného odhadu. Hodnocení vhodnosti (fitu) modelů bylo prováděno na základě chi-kvadrát statistiky. Dobrá shoda modelu s daty je v rámci faktorové analýzy a SEM indikovaná nesignifikantní chi-kvadrát statistikou alespoň na hladině $\alpha = 0.001$ (tedy když p-hodnota je vyšší než 0.001). K hodnocení vhodnosti modelů jsme dále vybrali nejpoužívanější indexy v oblasti SEM: root mean square error of approximation a standardized root mean square residuals, u kterých hodnoty pod 0.08 naznačují přijatelnost modelu. Dále jsme využili comparative fit index a Tucker Lewis index, u kterých jsou žádoucí hodnoty blížíící se 1 (akceptovatelné hodnoty pro tyto indexy jsou > 0.9). Analýza byla provedena pomocí programu Mplus 7.4 (Muthén & Muthén, 1998-2016).

Výsledky

ad a. Korelační analýza sérových markerů s klinickými, laboratorními a ultrazvukovými parametry aktivity RA

V této práci se nám podařilo prokázat elevaci některých sérových biomarkerů a jejich signifikantní korelace s klinickými, laboratorními a zejména ultrazvukovými parametry aktivity RA. Za nejvýznamnější považujeme signifikantní korelace IL-6, IL-22, calprotectinu, MMP-3, visfatinu, resistinu a CXCL-13 s klinickou a ultrasonografickou aktivitou nemoci (Tab. 10.). Jako další uvádíme signifikantní asociace mezi IL-7, IL-34, YKL-40 a sledovanými ukazateli zánětu. Korelace IL1 β , IFN γ a VEGF s některými ze sledovaných ukazatelů zánětů byly rovněž statisticky signifikantní, i když s mírně nižší hodnotou korelačního koeficientu. U IL-8, IL-12p70, IL-17A, IL-33, adiponektinu, leptinu a VCAM jsme významnější vztah s klinickou, laboratorní či ultrazvukovou aktivitou RA neprokázali.

Tab. 10. Vzájemné průřezové korelace klinických, laboratorních a ultrazvukových parametrů u pacientů s RA.

RA	FW	CRP	TJC	SJC	DAS28 - FW	DAS28 - CRP	SDAI	CDAI	GS syn	PD syn
IL-1 β	0.165 ^{NS}	0.261*	0.144 ^{NS}	0.238*	0.210 ^{NS}	0.249*	0.229*	0.217 ^{NS}	0.159 ^{NS}	0.173 ^{NS}
IL-6	0.565**	0.545**	0.402**	0.420**	0.570**	0.547**	0.553**	0.525**	0.443**	0.462**
IL-7	0.187 ^{NS}	0.393**	0.271*	0.181 ^{NS}	0.275*	0.288**	0.281*	0.268*	0.343**	0.202 ^{NS}
IL-8	0.141 ^{NS}	0.226*	0.177 ^{NS}	0.132 ^{NS}	0.214 ^{NS}	0.210 ^{NS}	0.211 ^{NS}	0.193 ^{NS}	0.173 ^{NS}	0.099 ^{NS}
IL-12p70	0.085 ^{NS}	0.082 ^{NS}	0.153 ^{NS}	0.155 ^{NS}	0.159 ^{NS}	0.179 ^{NS}	0.156 ^{NS}	0.155 ^{NS}	0.085 ^{NS}	0.159 ^{NS}
IL-17A	0.073 ^{NS}	0.170 ^{NS}	0.066 ^{NS}	0.082 ^{NS}	0.041 ^{NS}	0.086 ^{NS}	0.070 ^{NS}	0.049 ^{NS}	0.019 ^{NS}	0.026 ^{NS}
IL-22	0.601**	0.655**	0.553**	0.595**	0.757**	0.729**	0.699**	0.682**	0.619**	0.664**
IL-33	0.100 ^{NS}	0.194 ^{NS}	0.087 ^{NS}	0.117 ^{NS}	0.133 ^{NS}	0.146 ^{NS}	0.125 ^{NS}	0.104 ^{NS}	0.073 ^{NS}	0.085 ^{NS}
IL-34	0.092 ^{NS}	0.192 ^{NS}	0.234 ^{NS}	0.239 ^{NS}	0.298*	0.304*	0.326*	0.323*	0.344*	0.349*
Calprotectin	0.594**	0.653**	0.570**	0.571**	0.725**	0.700**	0.680**	0.666**	0.637**	0.606**
MMP3	0.356**	0.479**	0.396**	0.310**	0.446**	0.467**	0.398**	0.375**	0.353**	0.474**
Adiponectin	0.094 ^{NS}	0.146 ^{NS}	0.004 ^{NS}	0.095 ^{NS}	0.053 ^{NS}	0.023 ^{NS}	0.027 ^{NS}	0.034 ^{NS}	0.150 ^{NS}	0.078 ^{NS}
Visfatin	0.372**	0.456**	0.385**	0.324**	0.473**	0.443**	0.431**	0.419**	0.430**	0.309**
Resistin	0.367**	0.364**	0.224*	0.247*	0.363**	0.348**	0.344**	0.344**	0.273*	0.283*
YKL-40	0.460**	0.348**	0.150 ^{NS}	0.190 ^{NS}	0.334**	0.265*	0.257*	0.244*	0.259*	0.275*
VCAM	0.052 ^{NS}	0.024 ^{NS}	0.080 ^{NS}	0.180 ^{NS}	0.050 ^{NS}	0.028 ^{NS}	0.020 ^{NS}	0.019 ^{NS}	0.037 ^{NS}	0.024 ^{NS}
Leptin	0.016 ^{NS}	0.056 ^{NS}	0.016 ^{NS}	0.107 ^{NS}	0.056 ^{NS}	0.027 ^{NS}	0.030 ^{NS}	0.015 ^{NS}	0.026 ^{NS}	0.038 ^{NS}
IFN γ	0.262*	0.328**	0.132 ^{NS}	0.264*	0.268*	0.238*	0.226*	0.211 ^{NS}	0.195 ^{NS}	0.273*
VEGF	0.205 ^{NS}	0.286*	0.182 ^{NS}	0.174 ^{NS}	0.229*	0.249*	0.231*	0.202 ^{NS}	0.227*	0.138 ^{NS}
CXCL13	0.314**	0.305**	0.400**	0.426**	0.413**	0.423**	0.442**	0.424**	0.356**	0.447**
** Korelace je signifikantní ≤ 0.01										
* Korelace je signifikantní ≤ 0.05										
CDAI, Clinical Disease Activity Index; CRP, C-reaktivní protein; DAS28-CRP, Disease Activity Score pro 28 kloubů s C-reaktivním proteinem; DAS28-ESR, Disease Activity Score pro 28 kloubů se sedimentací; FW, sedimentace erytrocytů; GS syn skóre, Skóre synovitidy dle Grey Scale; PD syn score, Skóre synovitidy dle PD; SDAI, Simplified Disease Activity Index;										

Po definování skupin pacientů podle délky trvání nemoci jsme u pacientů s časnou RA pozorovali zesílení asociací některých analyzovaných sérových biomarkerů se sledovanými parametry zánětlivé aktivity RA ve srovnání s pacienty s déle trvající nemocí (Tab. 11., 12.). To platilo zejména pro calprotectin, IL-22 a MMP-3.

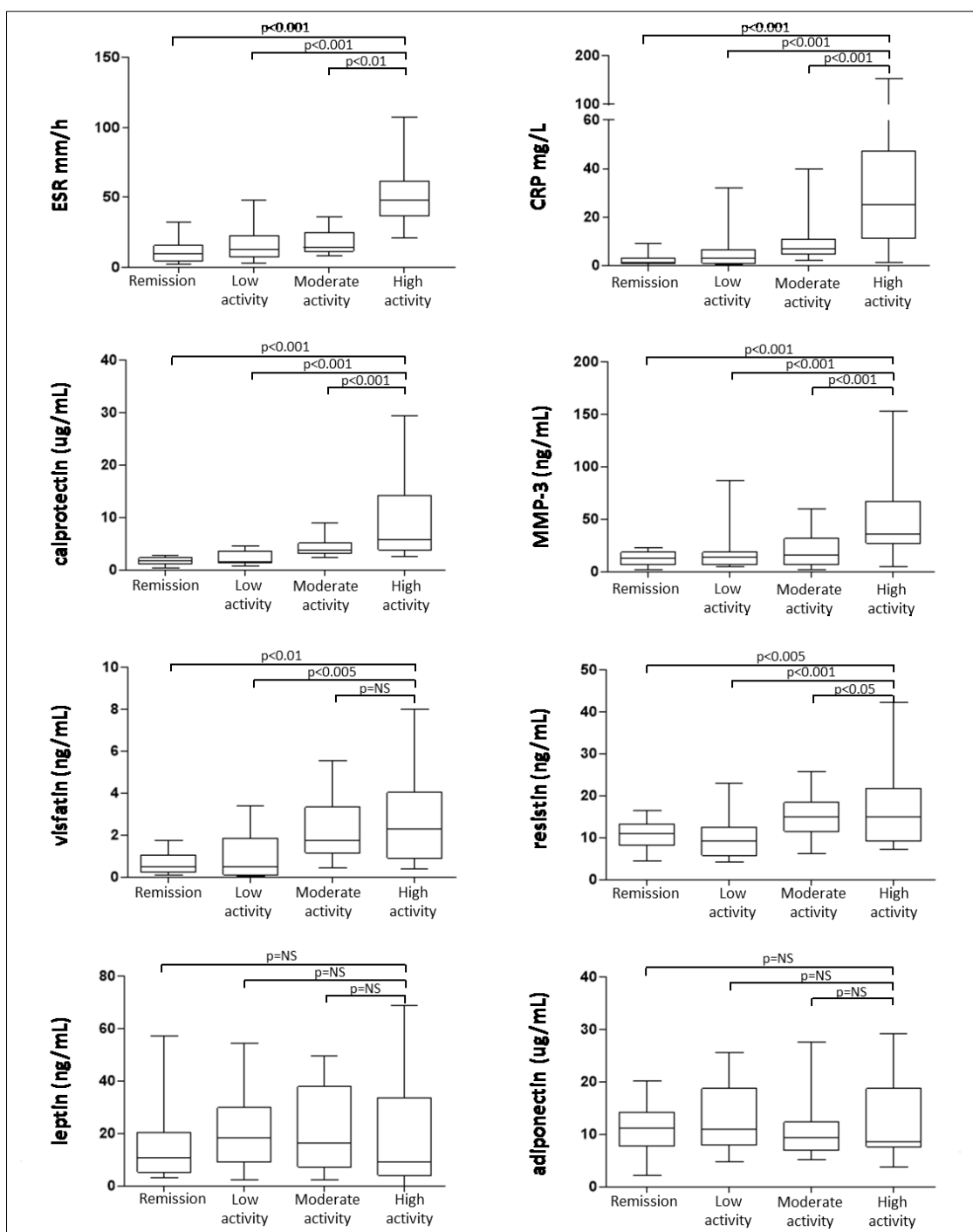
Tab. 11. Vzájemné průřezové korelace klinických, laboratorních a ultrazvukových parametrů u podskupiny pacientů s časnou RA.

Časná RA	FW	CRP	TJC	SJC	DAS28 - FW	DAS28 - CRP	SDAI	CDAI	GS syn	PD syn
IL-1 β	0.103 ^{NS}	0.268 ^{NS}	0.048 ^{NS}	0.282 ^{NS}	0.062 ^{NS}	0.083 ^{NS}	0.096 ^{NS}	0.104 ^{NS}	0.194 ^{NS}	0.204 ^{NS}
IL-6	0.331 ^{NS}	0.528**	0.473*	0.561**	0.485*	0.519**	0.548**	0.530**	0.588**	0.651**
IL-7	0.098 ^{NS}	0.398*	0.114 ^{NS}	0.151 ^{NS}	0.209 ^{NS}	0.255 ^{NS}	0.264 ^{NS}	0.237 ^{NS}	0.063 ^{NS}	0.182 ^{NS}
IL-8	0.159 ^{NS}	0.190 ^{NS}	0.122 ^{NS}	0.108 ^{NS}	0.022 ^{NS}	0.018 ^{NS}	0.006 ^{NS}	0.003 ^{NS}	0.151 ^{NS}	0.088 ^{NS}
IL-12p70	0.380 ^{NS}	0.016 ^{NS}	0.117 ^{NS}	0.068 ^{NS}	0.256 ^{NS}	0.194 ^{NS}	0.204 ^{NS}	0.209 ^{NS}	0.141 ^{NS}	0.070 ^{NS}
IL-17A	0.175 ^{NS}	0.146 ^{NS}	0.024 ^{NS}	0.026 ^{NS}	0.120 ^{NS}	0.048 ^{NS}	0.057 ^{NS}	0.061 ^{NS}	0.083 ^{NS}	0.057 ^{NS}
IL-22	0.600**	0.768**	0.765**	0.791**	0.819**	0.802**	0.799**	0.812**	0.801**	0.698**
IL-33	0.349 ^{NS}	0.069 ^{NS}	0.024 ^{NS}	0.088 ^{NS}	0.128 ^{NS}	0.063 ^{NS}	0.042 ^{NS}	0.069 ^{NS}	0.048 ^{NS}	0.029 ^{NS}
IL-34	0.404 ^{NS}	0.075 ^{NS}	0.031 ^{NS}	0.230 ^{NS}	0.060 ^{NS}	0.065 ^{NS}	0.053 ^{NS}	0.088 ^{NS}	0.204 ^{NS}	0.106 ^{NS}
Calprotectin	0.654**	0.757**	0.787**	0.687**	0.824**	0.811**	0.783**	0.768**	0.726**	0.734**
MMP3	0.452*	0.612**	0.355 ^{NS}	0.360 ^{NS}	0.441*	0.462*	0.470*	0.437*	0.548**	0.537**
Adiponectin	0.004 ^{NS}	0.011 ^{NS}	0.045 ^{NS}	0.180 ^{NS}	0.048 ^{NS}	0.033 ^{NS}	0.083 ^{NS}	0.097 ^{NS}	0.104 ^{NS}	0.043 ^{NS}
Visfatin	0.522**	0.552**	0.486*	0.326	0.485*	0.439*	0.374 ^{NS}	0.364 ^{NS}	0.442*	0.339 ^{NS}
Resistin	0.258 ^{NS}	0.221 ^{NS}	0.268 ^{NS}	0.312 ^{NS}	0.274 ^{NS}	0.298 ^{NS}	0.302 ^{NS}	0.280 ^{NS}	0.207 ^{NS}	0.397*
Leptin	0.166 ^{NS}	0.159 ^{NS}	0.107 ^{NS}	0.365 ^{NS}	0.286 ^{NS}	0.268 ^{NS}	0.343 ^{NS}	0.335 ^{NS}	0.350 ^{NS}	0.415 ^{NS}
YKL-40	0.373 ^{NS}	0.176 ^{NS}	0.168 ^{NS}	0.143 ^{NS}	0.229 ^{NS}	0.172 ^{NS}	0.182 ^{NS}	0.170 ^{NS}	0.342 ^{NS}	0.199 ^{NS}
VCAM	0.320 ^{NS}	0.306 ^{NS}	0.261 ^{NS}	0.151 ^{NS}	0.272 ^{NS}	0.266 ^{NS}	0.240 ^{NS}	0.200 ^{NS}	0.282 ^{NS}	0.321 ^{NS}
IFN γ	0.165 ^{NS}	0.036 ^{NS}	0.111 ^{NS}	0.233 ^{NS}	0.024 ^{NS}	0.070 ^{NS}	0.149 ^{NS}	0.143 ^{NS}	0.192 ^{NS}	0.241 ^{NS}
VEGF	0.249 ^{NS}	0.385 ^{NS}	0.262 ^{NS}	0.234 ^{NS}	0.244 ^{NS}	0.283 ^{NS}	0.300 ^{NS}	0.242 ^{NS}	0.228 ^{NS}	0.353 ^{NS}
CXCL13	0.357 ^{NS}	0.212 ^{NS}	0.296 ^{NS}	0.471*	0.383 ^{NS}	0.361 ^{NS}	0.429*	0.460*	0.489*	0.496*
** Korelace je signifikantní ≤ 0.01										
* Korelace je signifikantní ≤ 0.05										
CDAI, Clinical Disease Activity Index; CRP, C-reaktivní protein; DAS28-CRP, Disease Activity Score pro 28 kloubů s C-reaktivním proteinem; DAS28-ESR, Disease Activity Score pro 28 kloubů se sedimentací; FW, sedimentace erytrocytů; GS syn, Skóre synovitidy dle Grey Scale; GS ten, Skóre tenosynovitidy dle Grey Scale; IL, interleukin; MMP3, metaloproteináza 3; PD syn score, Skóre synovitidy dle Power Doppler; PD ten, Skóre tenosynovitidy dle Power Doppler; SDAI, Simplified Disease Activity Index; SJC, swollen joint count – počet oteklých kloubů; TJC, tender joint count – počet citlivých kloubů										

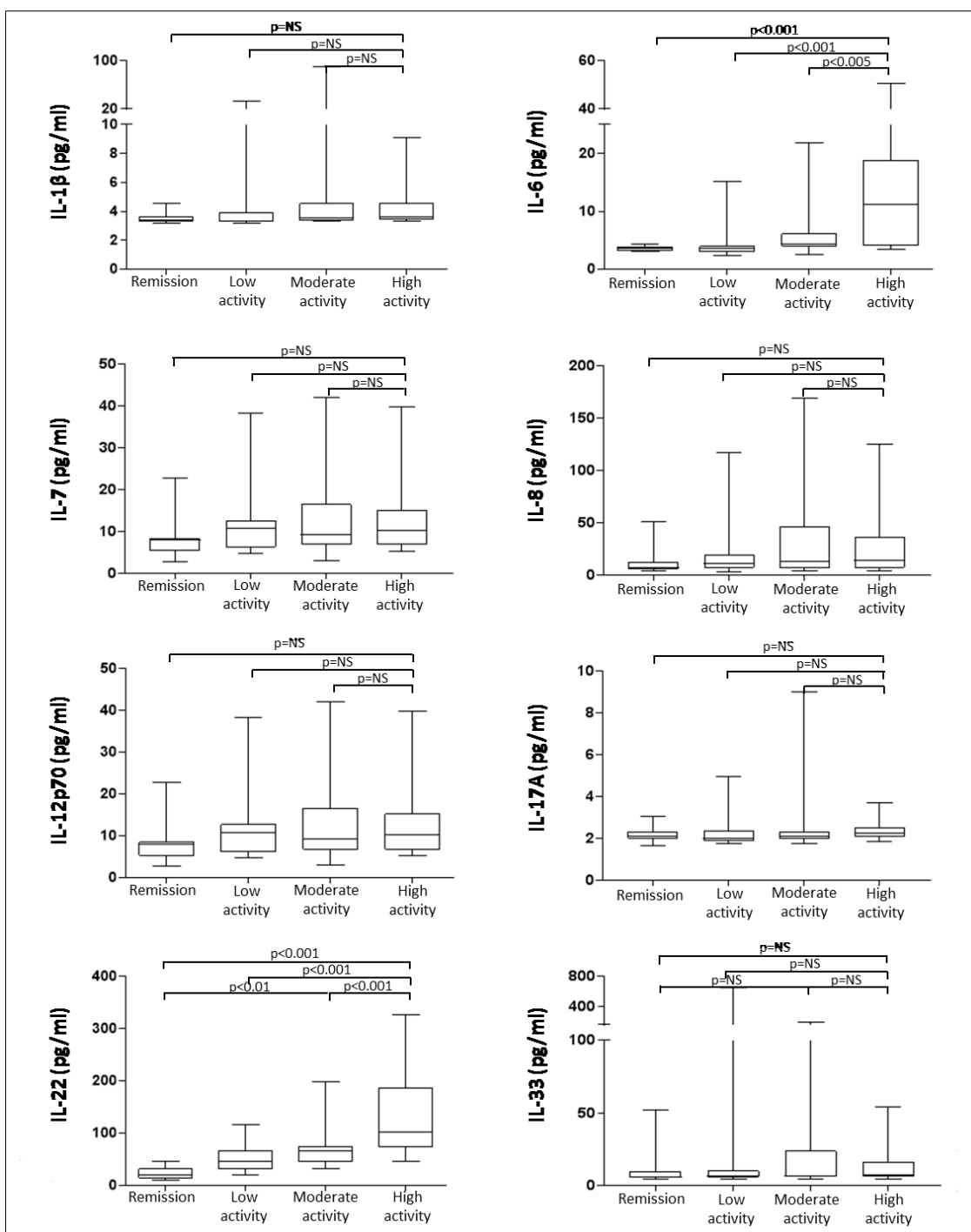
Tab. 12. Vzájemné průřezové korelace klinických, laboratorních a ultrazvukových parametrů u podskupiny pacientů s etablovanou RA.

Etablovaná RA	FW	CRP	TJC	SJC	DAS28 - FW	DAS28 - CRP	SDAI	CDAI	GS syn	PD syn
IL-1 β	0.271 ^{NS}	0.242 ^{NS}	0.208 ^{NS}	0.188 ^{NS}	0.278*	0.305*	0.310*	0.289*	0.119 ^{NS}	0.111 ^{NS}
IL-6	0.678**	0.584**	0.385**	0.266*	0.570**	0.550**	0.517**	0.476**	0.322*	0.310*
IL-7	0.203 ^{NS}	0.342*	0.187 ^{NS}	0.045 ^{NS}	0.195 ^{NS}	0.180 ^{NS}	0.182 ^{NS}	0.173 ^{NS}	0.444**	0.129 ^{NS}
IL-8	0.263 ^{NS}	0.207 ^{NS}	0.162 ^{NS}	0.126 ^{NS}	0.285*	0.241 ^{NS}	0.288*	0.260 ^{NS}	0.183 ^{NS}	0.079 ^{NS}
IL-12p70	0.286*	0.213 ^{NS}	0.102 ^{NS}	0.094 ^{NS}	0.137 ^{NS}	0.145 ^{NS}	0.166 ^{NS}	0.132 ^{NS}	0.062 ^{NS}	0.007 ^{NS}
IL-17A	0.125 ^{NS}	0.006 ^{NS}	0.223 ^{NS}	0.175 ^{NS}	0.246 ^{NS}	0.238 ^{NS}	0.223 ^{NS}	0.236 ^{NS}	0.076 ^{NS}	0.158 ^{NS}
IL-22	0.555**	0.566**	0.515**	0.449**	0.706**	0.679**	0.632**	0.606**	0.502**	0.597**
IL-33	0.287*	0.206 ^{NS}	0.064 ^{NS}	0.082 ^{NS}	0.202 ^{NS}	0.167 ^{NS}	0.152 ^{NS}	0.127 ^{NS}	0.090 ^{NS}	0.040 ^{NS}
IL-34	0.333 ^{NS}	0.343 ^{NS}	0.324 ^{NS}	0.165 ^{NS}	0.388*	0.424*	0.393*	0.364*	0.399*	0.403*
Calprotectin	0.524**	0.574**	0.481**	0.485**	0.676**	0.636**	0.629**	0.619**	0.677**	0.522**
MMP3	0.306*	0.406**	0.423**	0.207	0.466**	0.463**	0.358*	0.338*	0.242*	0.460**
Adiponectin	0.144 ^{NS}	0.114 ^{NS}	0.061 ^{NS}	0.085 ^{NS}	0.022 ^{NS}	0.003 ^{NS}	0.057 ^{NS}	0.058 ^{NS}	0.113 ^{NS}	0.142 ^{NS}
Visfatin	0.320*	0.375*	0.354*	0.303*	0.471**	0.439**	0.462**	0.453**	0.513**	0.273
Resistin	0.459**	0.461**	0.251	0.283*	0.441**	0.423**	0.384**	0.387**	0.342**	0.287*
Leptin	0.118 ^{NS}	0.249 ^{NS}	0.218 ^{NS}	0.126 ^{NS}	0.322*	0.322*	0.251 ^{NS}	0.257 ^{NS}	0.214 ^{NS}	0.248 ^{NS}
YKL-40	0.500**	0.462**	0.191 ^{NS}	0.210 ^{NS}	0.384**	0.361*	0.354*	0.335*	0.230 ^{NS}	0.312*
VCAM	0.034 ^{NS}	0.146 ^{NS}	0.023 ^{NS}	0.319*	0.058 ^{NS}	0.075 ^{NS}	0.135 ^{NS}	0.124 ^{NS}	0.016 ^{NS}	0.101 ^{NS}
IFN γ	0.429**	0.426**	0.082 ^{NS}	0.226 ^{NS}	0.334*	0.257 ^{NS}	0.224 ^{NS}	0.210 ^{NS}	0.206 ^{NS}	0.244 ^{NS}
VEGF	0.193 ^{NS}	0.202 ^{NS}	0.211 ^{NS}	0.232 ^{NS}	0.197 ^{NS}	0.237 ^{NS}	0.203 ^{NS}	0.166 ^{NS}	0.300*	0.028 ^{NS}
CXCL13	0.292*	0.322*	0.477**	0.416**	0.431**	0.451**	0.452**	0.419**	0.271 ^{NS}	0.428**
** Korelace je signifikantní ≤ 0.01										
* Korelace je signifikantní ≤ 0.05										
CDAI, Clinical Disease Activity Index; CRP, C-reaktivní protein; DAS28-CRP, Disease Activity Score pro 28 kloubů s C-reaktivním proteinem; DAS28-ESR, Disease Activity Score pro 28 kloubů se sedimentací; FW, sedimentace erytrocytů; GS syn, Skóre synovitidy dle Grey Scale; GS ten, Skóre tenosynovitidy dle Grey Scale; IL, interleukin; MMP3, metaloproteináza 3; PD syn score, Skóre synovitidy dle Power Doppler; PD ten, Skóre tenosynovitidy dle Power Doppler; SDAI, Simplified Disease Activity Index; SJC, swollen joint count – počet oteklých kloubů; TJC, tender joint count – počet citlivých kloubů										

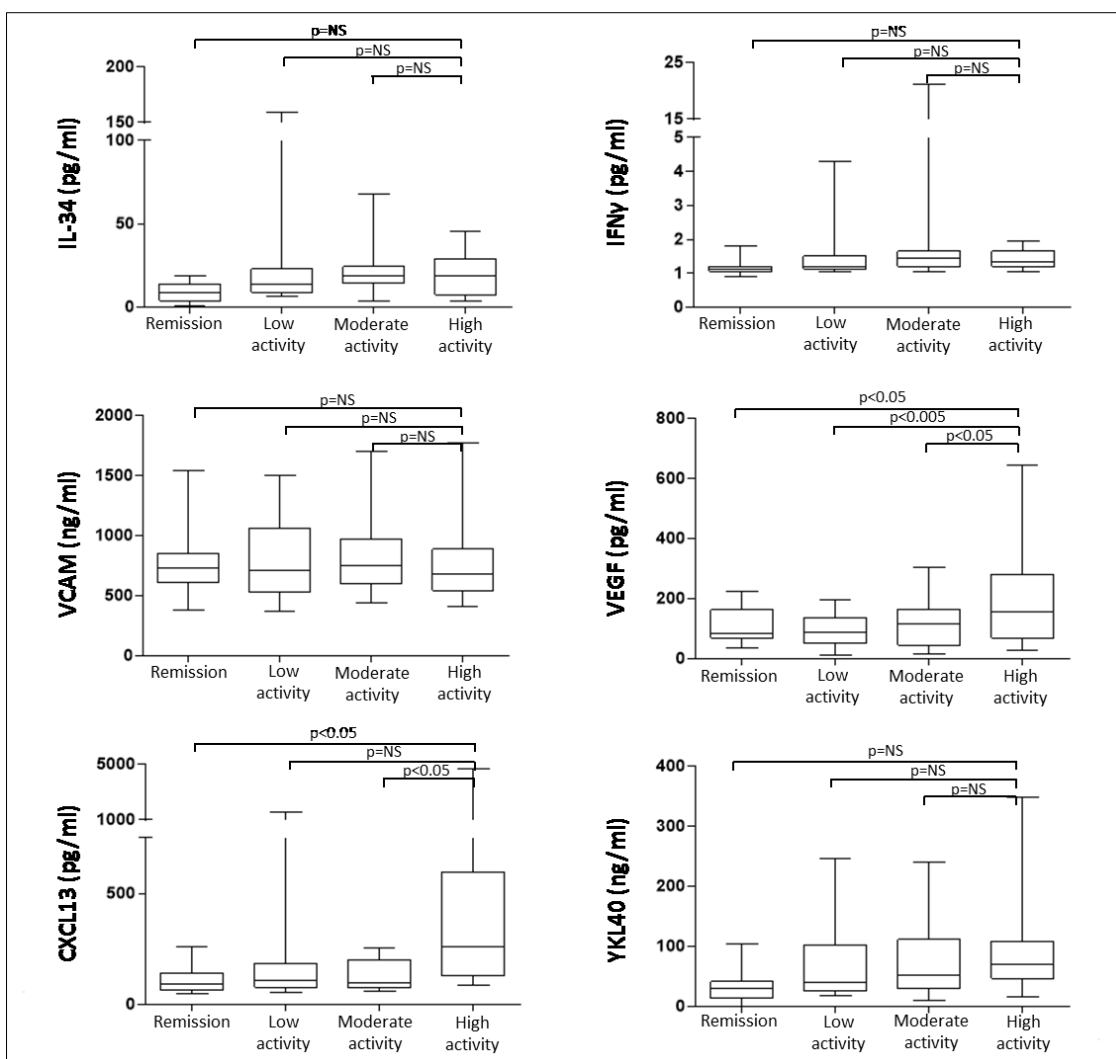
Koncentrace měřených sérových markerů u pacientů s RA uvádíme na Obr. 3.12.-3.17.



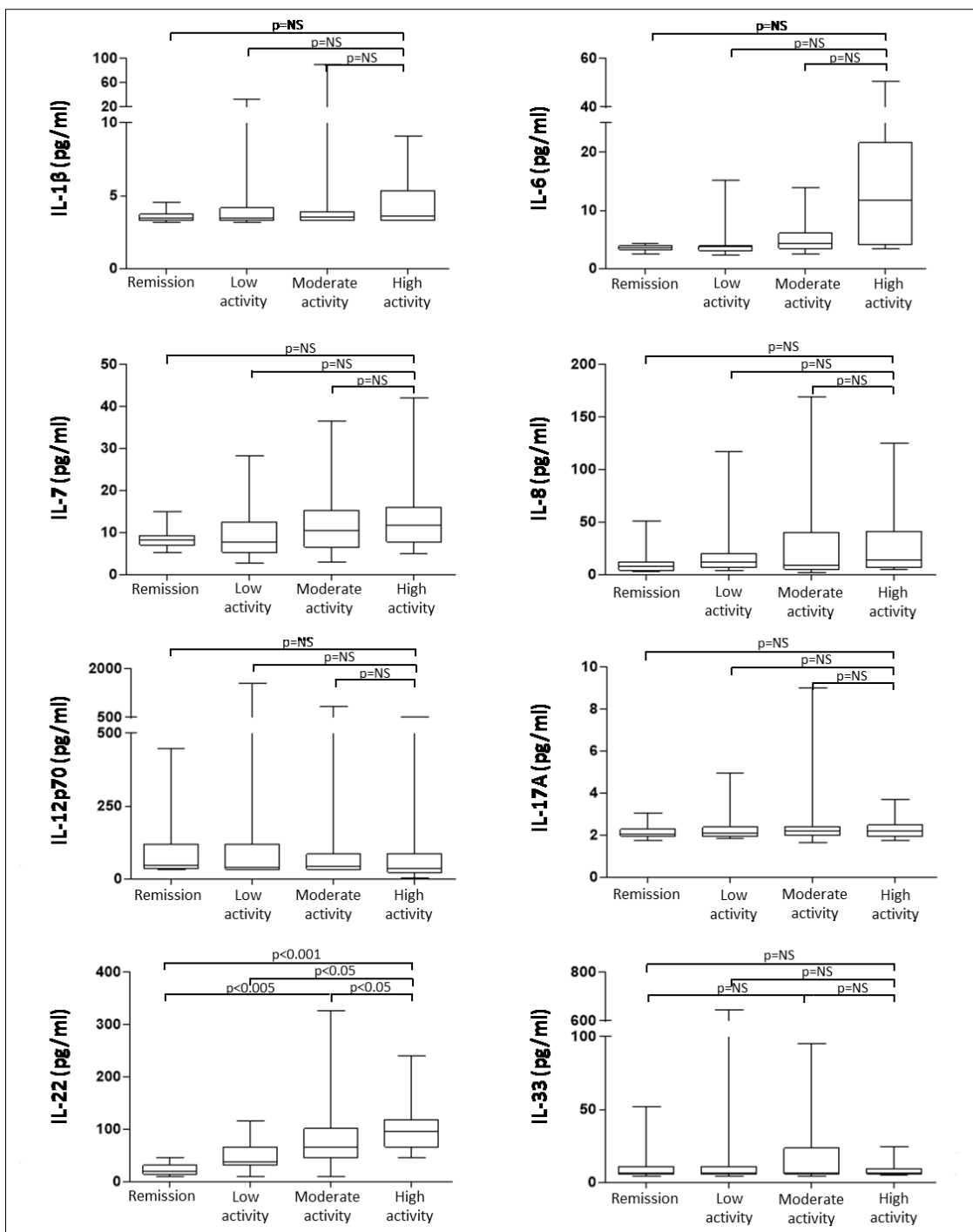
Obr. 3.12. Box ploty zobrazující vztahy sérových koncentrací vybraných markerů kloubního zánětu k aktivitě RA podle indexu DAS28.



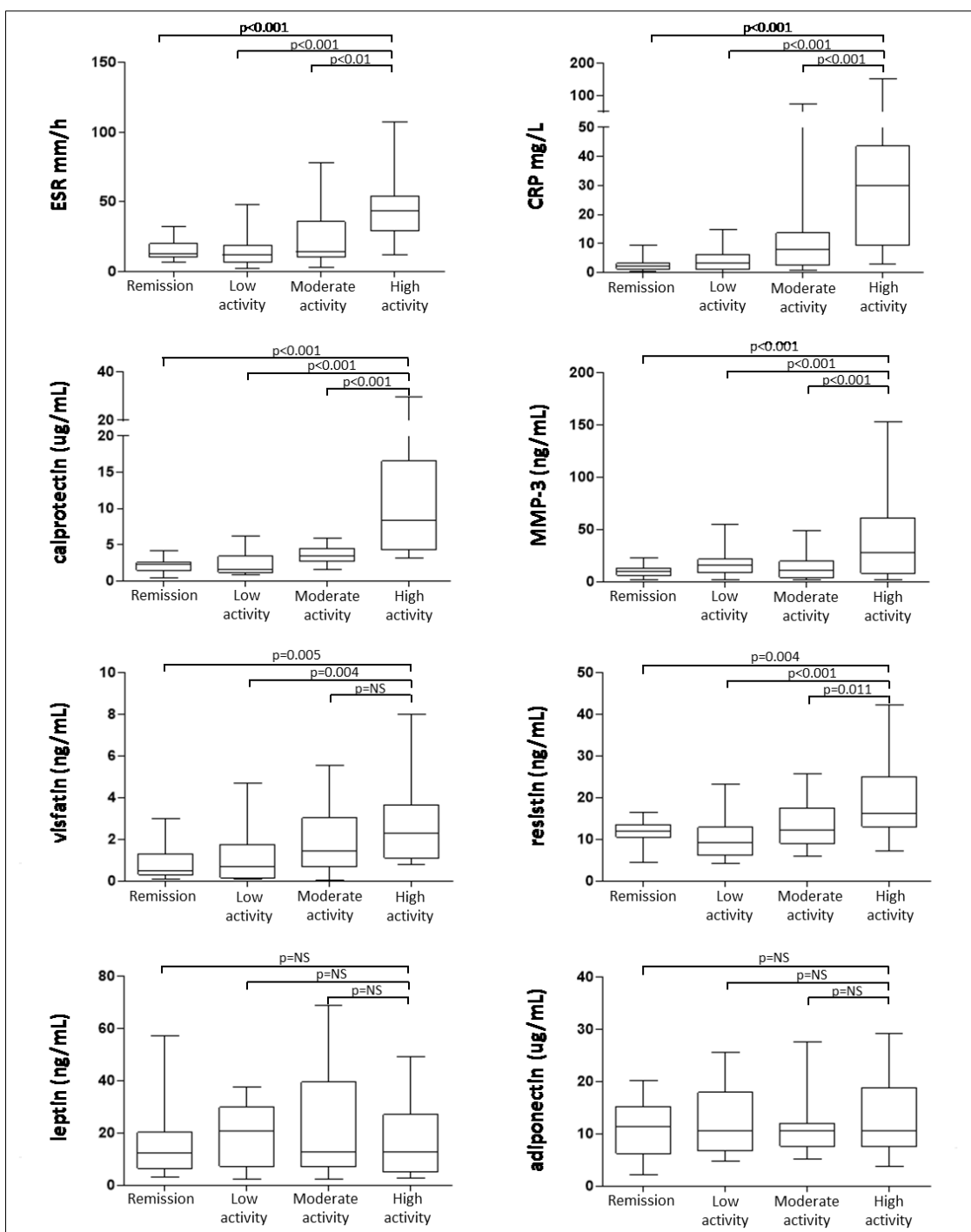
Obr. 3.13. Box ploty zobrazující vztahy sérových koncentrací vybraných markerů kloubního zánětu k aktivitě RA podle indexu DAS28.



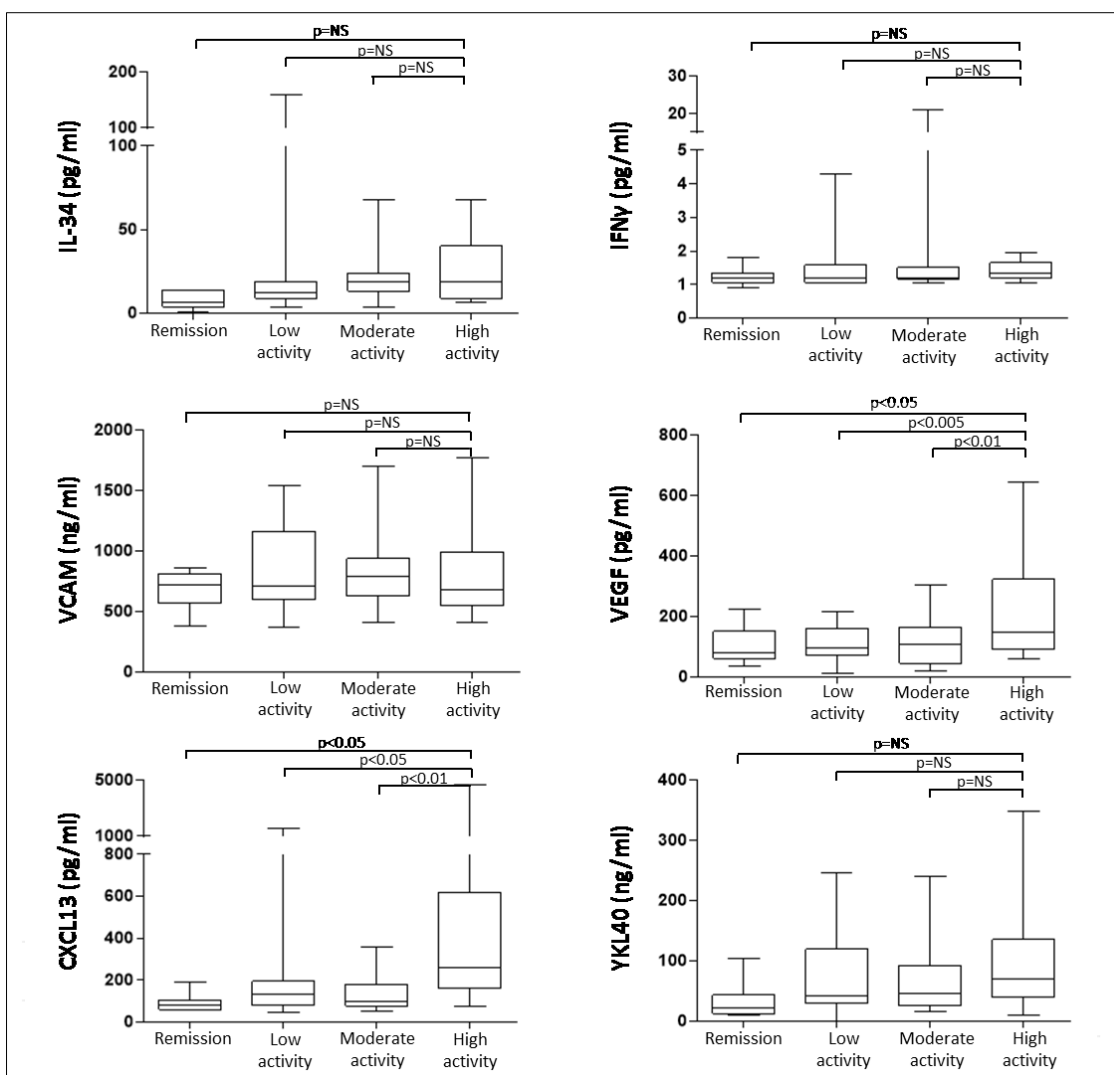
Obr. 3.14. Box ploty zobrazující vztahy sérových koncentrací vybraných markerů kloubního zánětu k aktivitě RA podle indexu DAS28.



Obr. 3.15. Box ploty zobrazující vztahy sérových koncentrací vybraných markerů kloubního zánětu k aktivitě RA podle indexu CDAI.



Obr. 3.16. Box ploty zobrazující vztahy sérových koncentrací vybraných markerů kloubního zánětu k aktivitě RA podle indexu CDAI.



Obr. 3.17. Box ploty zobrazující vztahy sérových koncentrací vybraných markerů kloubního zánětu k aktivitě RA podle indexu CDAI.

ad b. Vytvoření nástroje hodnocení aktivity RA na základě analýzy sérových biomarkerů

Pomocí EFA jsme z 20 manifestních proměnných (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17A, IL-22, IL-33, IL-34, IFN γ , MMP-3, YKL-40, CXCL8, CXCL13, VCAM-1, VEGF, leptinu, resistinu, visfatinu, adiponektinu, calprotectinu a CRP) vybrali 10, jejíž faktorové zátěže na prvním faktoru byly vyšší než 0.2 a dosáhly statistické významnosti (Tab. 13.).

Tab. 13. Výsledky explorativní faktorové analýzy.

Sérové markery	Faktorová zátěž	SE	p-hodnota
CALPROTECTIN	0.97	0.02	0.000
CRP	0.76	0.05	0.000
ADIPONECTIN	0.02	0.11	0.420
VISFATIN	0.51	0.09	0.000
MMP3	0.77	0.05	0.000
IL-7	0.31	0.1	0.002
RESISTIN	0.52	0.08	0.000
YKL-40	0.04	0.11	0.366
VCAM	-0.08	0.11	0.758
LEPTIN	-0.04	0.11	0.638
IL6	0.78	0.05	0.000
IFN γ	-0.01	0.11	0.528
VEGF	0.71	0.06	0.000
IL-22	0.33	0.1	0.001
IL-34	0.1	0.17	0.268
CXCL13	0.23	0.11	0.020
IL-33	-0.06	0.11	0.692
IL-8	0.09	0.11	0.204
IL-17A	0.01	0.11	0.483
IL-12P70	-0.01	0.11	0.531
SE, standard error			

Následně byla provedena konfirmativní faktorová analýza (CFA), která měla za cíl ověřit, zdali je jednofaktorový model skutečně nejvhodnějším popisem pozorovaných korelací mezi 10 vybranými proměnnými – tedy jestli těchto 10 proměnných skutečně měří jeden společný latentní faktor. Shoda jednofaktorového modelu s daty nebyla v tomto případě akceptovatelná, ($\chi^2(35) = 195.8$, $p < 0.001$, RMSEA=0.24, TLI = 0.98, CFI = 0.41, SRMR = 0.09), nicméně modifikační indexy identifikovaly dvě proměnné, které shodu modelu narušovaly nejvíce (visfatin, CXCL13). Po jejich vyloučení došlo k rapidnímu zlepšení shody modelu s daty ($\chi^2(20) = 29.4$, $p = 0.080$, RMSEA=0.76, TLI = 0.92, CFI = 0.94, SRMR = 0.05) a je tedy možné tvrdit, že těchto 8 proměnných (calprotectin, CRP, MMP-3, IL-6, VEGF, resistin, IL-22, IL-7) měří společný latentní faktor, který jsme nazvali “*Molecular Disease Activity*” - komplexní skóre aktivity RA.

Korelace vytvořeného nástroje - komplexního skóre aktivity RA - s klinickými a ultrazvukovými parametry aktivity RA

V této práci jsme prokázali významné asociace vytvořeného nástroje „*molecular disease activity*“ se všemi sledovanými klinickými i ultrazvukovými parametry aktivity RA (Tab. 14.).

Tab. 14. Vzájemné průřezové korelace identifikovaného faktoru „*molecular disease activity*“ s klinickými a ultrazvukovými parametry aktivity u pacientů s RA.

Parameters	Molecular disease activity (factor score)	<i>p</i> (significance)
DAS28-ESR	0.664**	< 0.001
DAS28-CRP	0.666**	< 0.001
SDAI	0.731**	< 0.001
CDAI	0.669**	< 0.001
TJC	0.591**	< 0.001
SJC	0.546**	< 0.001
GS syn score	0.657**	< 0.001
PD syn score	0.701**	< 0.001
** Correlation is significant at ≤ 0.01		
CDAI, Clinical Disease Activity Index; CRP, C-reactive protein; DAS28-CRP, Disease Activity Score with CRP; DAS28-ESR, Disease Activity Score with ESR; ESR, erythrocyte sedimentation rate; GS syn score, Grey Scale synovitis score; PD syn score, Power Doppler synovitis score; SDAI, Simplified Disease Activity Index; SJC, swollen joint count; TJC, tender joint count		

Využití strukturálního modelování

Pomocí strukturálního modelování (SEM) jsme dále ověřili, jak je identifikovaný latentní faktor „*Molecular Disease Activity*“ schopen reflektovat aktivitu onemocnění podle různě definovaných modelů.

- a. DAS28-FW
- b. CDAI
- c. GS syn a PD syn
- d. PD syn
- e. společně vyjádřenou aktivitu:
 - e1. DAS28 + GS syn + PD syn
 - e2. SJC + GS syn + PD syn
 - e3. GS syn + PD syn + CDAI

Výsledky SEM (fity modelů) pro všechny uvažované modely jsou uvedeny v Tab. 15.

Jak je patrné z tabulky, shoda s daty nebyla u modelů a), b) a e1) akceptovatelná. Akceptovatelné shody bylo dosaženo u modelů e2) a e3); a nejlepší fit dosáhly modely c) a d).

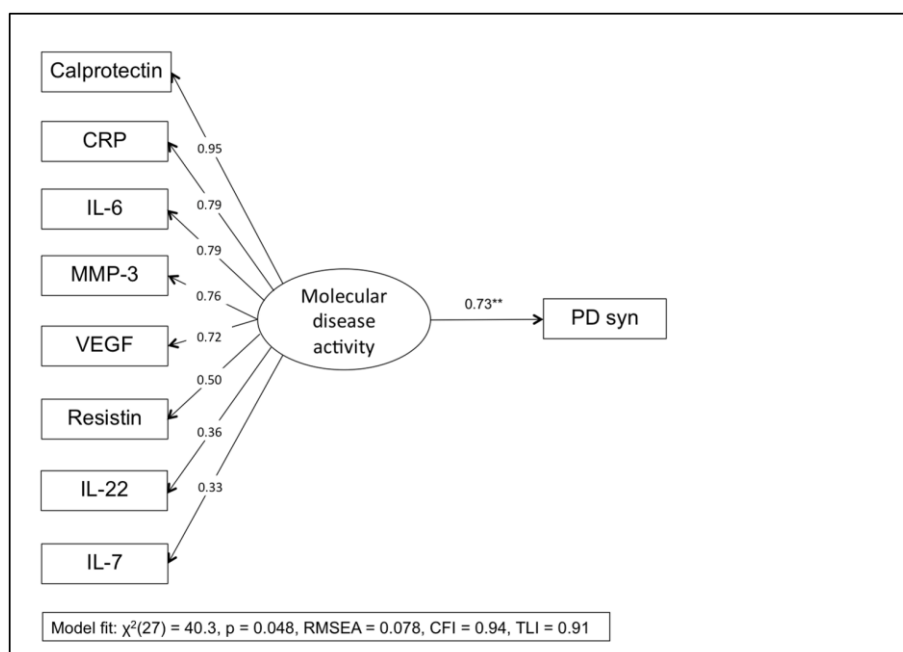
Tab. 15. Indexy fitů různých modelů.

Model	χ^2 (df)	p-value	CFI	TLI	RMSEA	SRMR
(a) DAS28	65.84 (27)	0.000**	0.83	0.77	0.132	0.07
(b) CDAI	53.90 (27)	0.002**	0.88	0.83	0.11	0.06
(c) PD syn + GS syn	51.88 (34)	0.026**	0.93	0.91	0.08	0.06
(d) PD syn	40.33 (27)	0.048**	0.94	0.91	0.078	0.05
(e1) PD syn + GS syn + DAS28	84.96 (43)	0.000**	0.89	0.85	0.109	0.07
(e2) PD syn + GS syn + SJC	69.74 (43)	0.006**	0.92	0.9	0.087	0.06
(e3) PD syn + GS syn + CDAI	70.04 (43)	0.006**	0.92	0.9	0.088	0.06

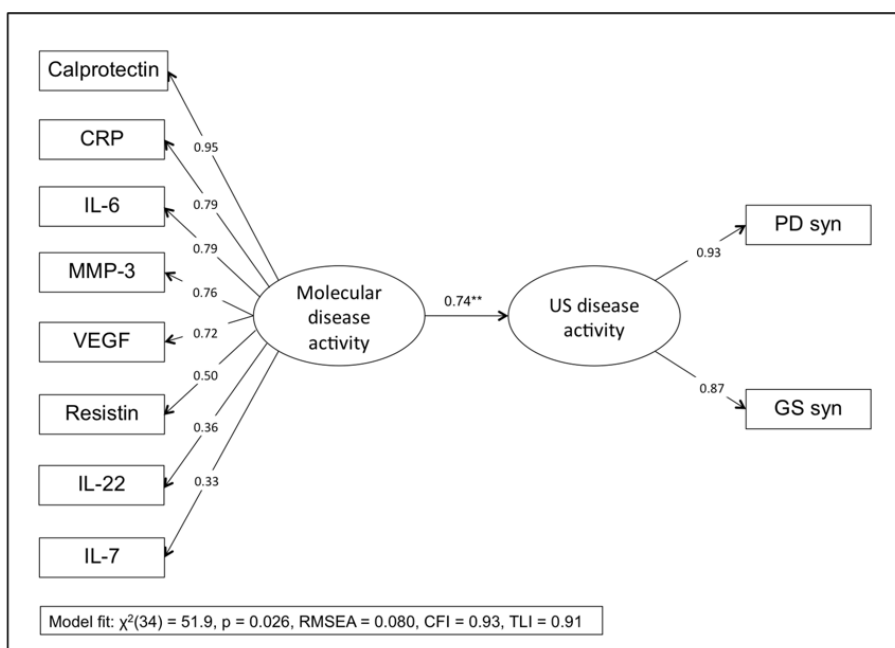
** Correlation is significant at ≤ 0.01

CDAI, Clinical Disease Activity Index; CFI, comparative fit index; DAS28, Disease Activity Score using 28 joints and erythrocyte sedimentation rate; GS syn, Grey scale synovitis; p, significance; PD syn, Power Doppler synovitis; RMSEA, root mean square error of approximation; SJC, swollen joint count; SRMR, standardized root mean square residuals; TLI, Tucker Lewis index

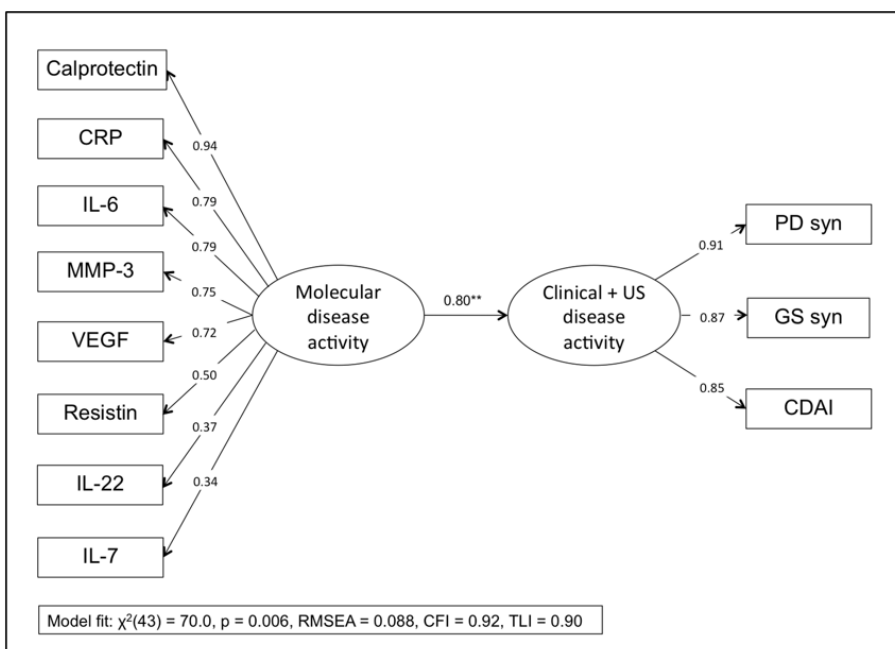
Pro modely, které dosáhly alespoň akceptovatelné shody s daty uvádíme na Obrázcích 3.18. až 3.21. i odhady vybraných parametrů (faktorové zátěže a regresní koeficienty). Ve všech případech byl faktor “*Molecular Disease Activity*” věcně ($\beta = 0.73$ až 0.80) i statisticky ($p < 0.001$) významným prediktorem aktivity onemocnění.



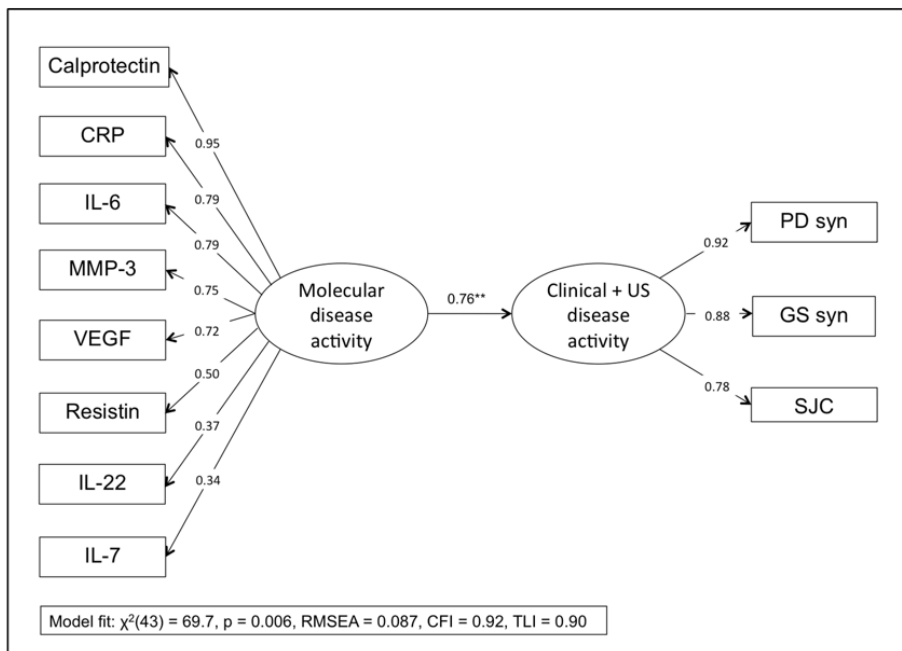
Obr. 3.18. Odhady parametrů pro model predikce aktivity onemocnění reprezentovanou jako PD syn.



Obr. 3.19. Odhady parametrů pro model predikce aktivity onemocnění reprezentovanou ultrazvukovými parametry GS syn a PD syn.



Obr. 3.20. Odhady parametrů pro model predikce aktivity onemocnění reprezentovanou ultrazvukovými parametry GS syn a PD syn a klinickým kompozitním indexem CDAI.



Obr. 3.21. Odhady parametrů pro model predikce aktivity onemocnění reprezentovanou ultrazvukovými parametry GS syn a PD syn a počtem oteklých kloubů.

4. DISKUSE

4.1. Metody hodnocení aktivity revmatoidní artritidy

Základním předpokladem úspěšné léčby RA je pravidelné hodnocení aktivity onemocnění a následná optimalizace terapie, která může významně zpomalit, nebo dokonce zastavit postupný vývoj destruktivních změn.

V současné době se k monitoraci aktivity nemoci využívají kompozitní indexy (nejčastěji DAS28, dále pak CDAI nebo SDAI), které se určují na základě hodnocení počtu oteklých a bolestivých kloubů, případně laboratorních parametrů (FW nebo CRP) (Prevoo M. L. et al., 1995, Smolen J. S. et al., 2003, Aletaha D. et al., 2005). Podle získaného skóre je možné u pacienta konstatovat vysokou, střední nebo nízkou aktivitu, eventuálně stav remise. Tyto hodnoty jsou pak určitým vodítkem, zda je nutné intenzifikovat terapii nebo naopak je možné přistoupit k deeskalaci, případně k vysazení potenciálně toxických proti-zánětlivých léků.

Měření aktivity tímto způsobem však má celou řadu nedostatků. V časných fázích nemoci, kdy kloubní otoky nejsou přesvědčivě palpovatelné, nemusí být klinické hodnocení dostatečně citlivé. Na druhou stranu, u etablované artritidy v terénu deformit a reziduální fibrózní tkáně je velice obtížné odlišit aktivní proces od chronických změn. S ohledem na tyto uvedené skutečnosti, je i pro zkušeného revmatologa opravdovou výzvou posouzení kloubních otoků. Problematická může být i další komponenta indexu DAS28 - bolestivost. Je obecně známo, že tento parametr má vysokou míru zátěže subjektivity, s velkým interindividuálním prahem vnímání. Navíc, chronické algické stavy jsou frekventně doprovázené sekundární fibromyalgií, což ještě dále zkresluje posouzení stavu nemocného. Pro objektivizaci zánětlivé aktivity je v indexu zahrnutý i laboratorní marker zánětu (CRP nebo sedimentace erytrocytů). Tyto laboratorní parametry jsou citlivými markery zánětu, nicméně nejsou pro revmatoidní artritidu specifické a k jejich elevaci může dojít i při koincidenci s jiným onemocněním. U pacientů léčených imunosupresivou není zřídka např. koincidence s infekčním onemocněním, kdy zvýšení zánětlivého parametru není v přímé souvislosti se základní diagnózou. Na druhé straně, zejména u déle trvající nemoci se nezdá setkávat s případy úplné absence reaktantů akutní fáze, a to i přes přítomnou vysokou klinickou aktivitu. Produkce C-reaktivního proteinu může být dále ovlivněna onemocněním jater. Parametr rychlost sedimentace erytrocytů může být ovlivněn řadou fyzikálně-chemických faktorů, jako např. často přítomná anemie

chronických chorob, obezita, věk, gravidita, atd. Všechny uvedené faktory mohou významným způsobem zkreslit výslednou hodnotu kompozitního indexu, která by měla vypovídat o skutečné aktivitě nemoci.

V současné době se proto různé vědecké týmy snaží vytvořit objektivnější algoritmy hodnocení aktivity, které by doplňovaly tyto tradiční kompozitní indexy. Inovativní metodou je hodnocení pomocí citlivé ultrazvukové zobrazovací metody, která umožnila přímou vizualizaci zánětlivých procesů probíhajících v kloubu. Pomocí vytvořených ultrazvukových skórovacích indexů je možné kvantifikovat různé USG patologie a vypočítat ultrazvukové skóre aktivity, které podobně jako ty klinické, reflektuje aktivitu onemocnění. Z vědeckého pohledu se tak ultrazvuková metoda stala atraktivním nástrojem pro sledování vzniku, vývoje a udržování zánětlivých procesů u RA.

Zcela jiným přístupem je stanovování markerů kloubního zánětu přímo z krve pacienta. Pokroky v této oblasti nastaly zejména pochopením a identifikací některých patomechanizmů podílejících se na vzniku a udržování chronicity zánětlivých procesů v kloubech. Atraktivita tohoto přístupu také spočívá v její jednoduchosti, dobré dostupnosti biologického materiálu k experimentům, a možností standardizace měření. Přes velikou snahu je však v současné době popsanych pouze několik málo sérových markerů, které dobře reflektují zánětlivou aktivitu kloubů.

Cílem této práce bylo zjistit, zda se koncentrace některého z moderních sérových markerů dynamicky mění s aktuální aktivitou kloubního zánětu a jestli mají takové ukazatele aditivní úlohu a dostatečný potenciál pro hodnocení aktivity nemoci.

4.2. Vztah sérového calprotectinu k aktivitě revmatoidní artritidy

Velmi slibným se z tohoto pohledu jeví calprotectin (S100A8/9), proto mu v našem projektu byla věnována osobitá pozornost. Calprotectin je na rozdíl od jiných reaktantů akutní fáze uvolňován v místě zánětu a tedy přímo odráží množství synoviálních makrofágů a počet aktivovaných leukocytů v zánětlivém kloubu (John B. et al., 1997). Calprotectin se po uvolnění z imunokompetentních buněk váže na toll-like receptor-4 (TLR-4) exprimovaný na makrofázích a cestou aktivace prozánětlivé signální dráhy NFκB spouští kaskádu dalších zánětlivých reakcí (Sunahori K. et al., 2006). Jeho zvýšené koncentrace byly opakovaně nalezeny v synoviální tekutině pacientů s RA (Berntzen H. B. et al., 1991). Vzhledem k tomu, že se jedná o malou

molekulu (36,5 kDa), lehce difunduje přes stěny kapilár do cirkulace, kde jej můžeme pohodlně měřit (Wilkinson M. M. et al., 1988). Řada studií dokumentovala úzkou asociaci hladin calprotectinu v synoviální tekutině s jeho koncentracemi v séru či plazmě. Podobně několik prací poukázalo na významné korelace hladin calprotectinu s aktivitou nemoci vyjádřenou klinicky i pomocí tradičních laboratorních ukazatelů zánětu (hodnotami CRP, FW) (Andres Cerezo L. et al., 2011, Garcia-Arias M. et al., 2013). V minulosti bylo také prokázáno, že vysoké koncentrace calprotectinu na začátku onemocnění mohou predikovat zvýšené riziko rychlé radiografické progresse (Hammer H. B. et al., 2010).

Méně prozkoumaným byl vztah calprotectinu k zánětlivé aktivitě detekované ultrazvukem, která je považována za citlivější nástroj hodnocení kloubního zánětu než klinické vyšetření. Výsledky pilotní práce Hammer a kol. na malém vzorku pacientů naznačily, že koncentrace calprotectinu měřeného v plazmě pacientů jsou asociovány s ultrazvukovými parametry aktivity RA (Hammer H. B. et al., 2011). V souladu s těmito výsledky jsme v naší práci na rozšířené kohortě pacientů potvrdili, že hladiny sérového calprotectinu významně korelují s klinickými, tradičními laboratorními a navíc ultrazvukovými parametry aktivity RA. Za nejdůležitější považujeme právě vztah mezi calprotectinem a (PD), který detekuje patologickou neovaskularizaci synoviální tkáně a přímo tak reflektuje aktivně probíhající zánět. V naší práci jsme navíc využitím multivariantní analýzy odhalili, že calprotectin je lepším prediktorem aktivní ultrazvukové synovitidy než CRP. Později byly podobné výsledky publikovány i další zahraniční skupinou (Nordal H. H. et al., 2017).

V projektu jsme se dále zaměřili na podskupinu pacientů v klinické remisi. Je totiž známo, že u části pacientů přes dosažení klinické remise nadále dochází k strukturální progresi (Cohen G. et al., 2007). Tento jev lze teoreticky vysvětlit přítomností subklinické aktivity, kterou nelze jednoduše detekovat běžnými dostupnými metodami. V současnosti existuje několik studií dokumentujících nálezy reziduální aktivity u pacientů se zdánlivou remisí (Brown A. K. et al., 2006). Tento subklinický zánět lze spolehlivě detekovat citlivými zobrazovacími metodami, jako např. magnetická rezonance či muskuloskeletální ultrasonografie (Brown A. K. et al., 2008). Některé práce dokonce uvádí, že až u 45-60% pacientů v klinické remisi je možné pomocí US detekovat subklinickou kloubní aktivitu (Scire C. A. et al., 2009, Balsa A. et al., 2010).

V této části našeho projektu jsme si proto dali za cíl objasnit, zda sérový calprotectin má dostatečnou diskriminační schopnost odlišit subklinickou aktivitu od tzv. „hluboké“ US remise. Prokázali jsme, že u pacientů s přetrvávající reziduální US aktivitou jsou hladiny sérového calprotectinu zvýšené oproti pacientům v ultrazvukové remisi. Naše úvahy o možném využití calprotectinu u pacientů v klinické remisi podpořilo i využití ROC křivek, pomocí kterých jsme prokázali, že sérový calprotectin, na rozdíl od konvenčně používaného CRP, dokáže lépe odlišit pacienty, u kterých byla hluboká remise potvrzena sonograficky od nemocných, u kterých nadále přetrvávala subklinická aktivita detekovaná citlivou zobrazovací metodou. Velmi recentní práce publikovaná v prestižním revmatologickém časopise potvrdila naše dříve zveřejněné poznatky (Jonsson M. K. et al., 2017).

Neméně zanedbatelným problémem v klinické praxi je nízká koncentrace CRP u části pacientů s klinicky střední či vysokou kloubní aktivitou. S tímto jevem se setkáváme nejčastěji u pacientů s déle trvajícím onemocněním, kdy nedochází k očekávané syntéze proteinů akutní fáze v hepatocytech, adekvátní k probíhajícím zánětlivým dějům. Některé práce popisují, že až 35-45% pacientů s aktivní RA má normální reaktanty akutní fáze, což značným způsobem znesnadňuje správné komplexní hodnocení aktivity RA (Pincus T. and Sokka T. 2009, Sokka T. and Pincus T. 2009). Jiní autoři se domnívají, že tato čísla mohou být dokonce ještě vyšší (Pincus T. et al., 2014). Nutnost identifikace moderního biomarkeru, který by objektivně reflektoval zánětlivou reakci u této skupiny pacientů a měl by tak aditivní roli k běžně stanovovaným reaktantům akutní fáze, je teda nezpochybnitelná.

Naše výsledky ukazují, že hladiny sérového calprotectinu jsou u skupiny pacientů s normálními/nízkými hladinami CRP přes přítomnost klinicky aktivní nemoci signifikantně zvýšeny ve srovnání s pacienty s normálními/ nízkými hladinami CRP, kteří byli v remisi nebo měli nízkou klinickou aktivitu a rovněž ve srovnání se zdravou kontrolní populací. Tyto úvahy byly podpořeny i prokázáním dobré diskriminační schopnosti calprotectinu při identifikaci pacientů se střední/vysokou aktivitou s normálním/nízkým CRP. Z těchto poznatků lze usuzovat, že sérový calprotectin může v určitých aspektech nabídnout relevantnější obraz o probíhajícím kloubním zánětu než dosud tradičně používané laboratorní ukazatele zánětu (např. FW nebo CRP). Otázkou do budoucna zůstává, zda měření tak slibného markeru zánětu jakým bezpochyby

calprotectin je, bude mít dostatečný přínos k rutinně stanovovaným markerům zánětu a stane se součástí běžné laboratorní revmatologické praxe.

4.3. Vztah dalších moderních markerů kloubního zánětu k aktivitě revmatoidní artritidy. Vytvoření komplexního modelu sérových biomarkerů reflektujícího zánětlivou aktivitu revmatoidní artritidy

V další části projektu jsme se zaměřili na detailní analýzu širokého spektra potenciálních ukazatelů aktivity RA. Na základě podrobné literární rešerše jsme vytipovali 20 slibných markerů kloubního zánětu. Použitím korelačních analýz v úvodu této studie jsme odhalili několik zajímavých asociací. Jednak se nám z řady 20 různých sérových markerů potvrdila velmi významná asociace právě výše zmiňovaného calprotectinu s klinickými i ultrazvukovými parametry aktivity, která byla mezi 20 studovanými biomarkery nejvýznamnější. Z dalších velmi významných asociací uvádíme signifikantní korelace IL-6, IL-7, IL-22, IL-34, YKL-40, CXCL-13, MMP-3, resistinu a visfatinu s klinickou a ultrasonografickou aktivitou RA. Korelace IL1 β , IFN γ a VEGF s některými ze sledovaných ukazatelů aktivity RA byly rovněž statisticky signifikantní, i když je nutno poznamenat, že jejich korelační koeficienty prokázaly o něco méně významné asociace. U IL-8, IL-12p70, IL-17A, IL-33, adiponektinu, leptinu a VCAM jsme významnější vztah s klinickou, laboratorní či ultrazvukovou aktivitou revmatoidní artritidy neprokázali.

Naše výsledky jsou v souladu s prací publikovanou v loňském roce, ve které autoři zkoumali asociaci calprotectinu, S100A12, IL-6 a VEGF s klinickou a ultrazvukovou aktivitou (Nordal H. H. et al., 2017). Autoři této studie prokázali úzký vztah calprotectinu a IL-6 se sledovanými ukazateli, přičemž nejvýznamnějším v této studii byl právě vztah calprotectinu s klinickými i ultrazvukovými parametry aktivity. Významná role IL-6 jako markeru reflektujícího zánětlivou aktivitu byla kromě naší práce a této studie potvrzena i v dalších recentně publikovaných pracích (Baillet A. et al., 2015, do Prado A. D. et al., 2016). Např. kolektiv autorů pod vedením M. Dougadose prokázal, že IL-6 lépe reflektuje počet oteklých kloubů u pacientů s časnou RA než CRP. Tato studie rovněž prokázala signifikantní korelaci IL-6 s ultrazvukovou aktivitou (Baillet A. et al., 2015).

Autoři jiné práce podobně deklarovali významné asociace IL-6 s klinickou aktivitou

vyjádřenou pomocí DAS28 a také se synoviální hypertrofií podle GS a indexem hypervaskularizace synoviální tkáně podle PD. Tento vztah nebyl prokázán u dalších cytokinů analyzovaných v této studii (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, TNF, IFN γ a VEGF) (do Prado A. D. et al., 2016).

Dalším z potenciálních markerů aktivity RA zkoumaných v naší práci byl chemoatraktant B-lymfocytů – CXCL13. V této studii jsme prokázali jeho významnou asociaci s měnící se zánětlivou aktivitou vyjádřenou jak klinickými, laboratorními a také ultrazvukovými ukazateli, což bylo v souladu s výsledky dalších publikovaných prací (Bugatti S. et al., 2012).

Význam stanovování vaskulárního endoteliálního faktoru VEGF v séru pacientů s RA je poněkud kontroverzní. Opakovaně byly zjištěny jeho zvýšené koncentrace u pacientů s RA ve srovnání s jedinci s OA či se zdravou populací (Lee S. S. et al., 2001, Knudsen L. S. et al., 2008). Některé práce rovněž poukázaly na možnou asociaci VEGF s kompozitními indexy aktivity RA (Sone H. et al., 2001). Jiná studie zkoumající histologickou závažnost synoviality, hypervaskularizaci, přítomnost PD signálu na ultrazvuku a expresi VEGF na úrovni mRNA prokázala úzký vztah mezi sledovanými parametry (Kelly S. et al., 2015). Překvapivě, novější studie zkoumající vztah sérových hladin VEGF s ultrazvukovou aktivitou podle PD - metodou hodnotící patologickou hypervaskularizaci, nepřinesla očekávané výsledky (Nordal H. H. et al., 2017). Naše data sice poukázaly na určitou asociaci VEGF s aktivitou vyjádřenou pomocí kompozitních indexů, nicméně jasný vztah mezi sérovými koncentracemi tohoto vaskulárního endoteliálního faktoru a hypervaskularizací podle PD souhlasně se zmiňovanou recentnější prací prokázán nebyl.

Identifikace jednotlivých biomarkerů je základním předpokladem vzniku složitějších modelů, které by mohly lépe vypovídat o komplexitě zánětlivých procesů u pacientů s RA. Proto jsme v naší další studii přistoupili k využití moderních statistických metod a pokusili jsme se vytvořit komplexní molekulární index aktivity nemoci. V tomto modelu již konkrétní biomarkery nevystupují “izolovaně”, ale jsou součástí matrice, ve které se vzájemně ovlivňují. Z původního souboru dvaceti analyzovaných biomarkerů jsme složitými výpočty dospěli k 8 nejvhodnějším kandidátům. Tyto jsou: calprotectin, CRP, IL-6, MMP-3, VEGF, resistin, IL-22, IL-7. Jejich síla či významnost v daném modelu je dána pořadím, tzn. že největší výpovědní hodnotu v daném modelu má calprotectin, poté CRP, za nimi následuje IL-6, atd. Vzájemnými interakcemi je možné

vysvětlit např. významnou roli VEGF v společném modelu zánětlivé aktivity, i když jak již dříve uvedeno, samotný VEGF koreloval s konvenčními či ultrazvukovými ukazateli aktivity méně významně.

Nedávno byl vytvořen komerčně dostupný systém hodnocení komplexní aktivity RA pomocí 12 pro-zánětlivých markerů a růstových faktorů v rámci tzv. “multi-biomarker disease activity” skóre (MBDA): CRP, leptin, resistin, sérový amyloid, IL-6, TNF-RI, VEGF-A, MMP-1, YKL-40, MMP-3, EGF, VCAM-1 (Centola M. et al., 2013). Původně bylo analyzováno 130 markerů, včetně např. sérového calprotectinu, který byl překvapivě z dalších analýz vyřazen. Tato studie následně prokázala úzkou asociaci MBDA s klinickými kompozitními indexy RA a schopnosti MBDA odlišit pacienty v remisi nebo s nízkou aktivitou od nemocných se střední nebo vysokou aktivitou vyjádřenou dle DAS28-CRP. Pokles v MBDA skóre v průběhu léčby se rovněž ukázalo jako přínosné v stratifikaci pacientů na “respondery” či “non-respondery” na terapii methotrexátem a anti-TNFalfa blokátory (Curtis J. R. et al., 2012). Data ze švédské kohorty SWEFOT (Swedish Farmaco therapy randomized clinical trial) poukázaly na schopnost MBDA skóre nezávisle predikovat radiografickou progresi po 1 roce u pacientů s časnou RA (Hambardzumyan K. et al., 2015, Hambardzumyan K. et al., 2016).

Autoři některých prací zkoumajících význam stanovování komplexní “molekulární” aktivity zahrnuli k původním 12 biomarkerům i jiné slibné sérové markery. Např. Bakker et al. v studii CAMERA (computer assisted management in early rheumatoid arthritis) analyzoval kromě biomarkerů obsažených v MBDA navíc 8 dalších markerů kloubního zánětu, včetně sérového calprotectinu, který měl opět mezi stanovovanými markery významné postavení (Bakker M. F. et al., 2012).

V této studii jsme zjistili významnou asociaci námi vytvořeného modelu “*Molecular Disease Activity*” na základě kombinace 8 sérových markerů s klinickými a ultrazvukovými parametry zánětů. Korelace navrženého modelu byly dokonce významnější než u indexu MBDA složeného z 12 biomarkerů (Hirata S. et al., 2013). což potvrzuje vhodnost výběru kandidátních markerů v tomto modelu.

Navíc jsme v naší práci přistoupili k využití strukturálního modelování, a to v snaze určit, který ze současně používaných ukazatelů či indexů aktivity RA (DAS28, CDAI, SJC) je našim systémem nejlépe reflektován. Také nás zajímalo, jestli existují i jiné

komponenty hodnotící zánětlivou aktivitu (např US), které by přispěly ke zdokonalení tohoto indexu. Jako nejvhodnější modely komplexní aktivity RA, které odrážejí přítomnost a dynamickou elevaci 8 zánětlivých biomarkerů se ukázaly parametry ultrazvukové aktivity PD syn + GS syn, a dále modely složené z: PD syn + GS syn + SJC a také model PD syn + GS syn + CDAI. Zdá se tedy, že vzájemná interakce 8 zánětlivých biomarkerů nejlépe vystihuje aktivitu RA danou některým z klinických ukazatelů či kompozitních indexů (CDAI nebo SJC, ale ne DAS28) společně s ultrazvukovou aktivitou, což také potvrzuje hypotézu, že ultrazvukové hodnocení vhodně doplňuje komplexní systémy hodnocení aktivity RA.

5. ZÁVĚR

Z našich výsledků vyplývá několik důležitých poznatků. Prokázali jsme významnou roli sérového calprotectinu jako markeru aktivity RA, který lépe než konvenčně stanovované proteiny akutní fáze predikuje klinickou i ultrazvukovou aktivitu. Dále jsme prokázali úzký vztah některých analyzovaných markerů kloubního zánětu, konkrétně IL-6, MMP-3, visfatinu, IL-22, IL-7, IL-34, YKL-40, CXCL-13, resistinu a visfatinu. Důležitým výstupem této práce je vytvoření nástroje hodnocení komplexní zánětlivé aktivity u RA složený z 8 kandidátních sérových markerů. Domníváme se, že stanovování těchto specifických biomarkerů může významně přispět k zlepšení hodnocení aktivity nemoci, optimalizaci terapie a zlepšení dlouhodobé prognózy pacientů. Do budoucna plánujeme námi navrhovaný nástroj hodnocení komplexní zánětlivé aktivity RA validovat na větší kohortě pacientů a přinést výzkum do stádia udělení patentu.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACR	American College of Rheumatology
Acrp30	adipocyte complement-related protein of 30 kDa
ADAMTS-7/ADAMTS-12	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-7, -12
AdipoR1 a AdipoR2	trans-membránové receptory
AMPK	adenosine monophosphate- activated protein kinase
apM1	adipose most abundant gene transcript 1
CAMERA	computer assisted management in early rheumatoid arthritis
CD4+	Cluster of differentiation 4+
CDAI	Clinical Disease Activity Index
CFA	Confirmatory Factor Analysis
CFI	comparative fit index
CRP	C-reactive protein
CXCL13	CXC rodina chemokinů
DAS28	Disease Activity Score using 28 joints
EFA	Exploratory Factor Analysis
ELAM-1	endothelial leukocyte adhesion molecule/E-selektin-1
ELISA	the enzyme-linked immunosorbent assay
ESR	erythrocyte sedimentation rate
EULAR	European League Against Rheumatism
FW	Rychlost sedimentace erytrocytů
G-CSF	granulocyty-stimulující faktor
GBP28	gelatin binding protein of 28 kDa
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
GS	Grey Scale
HAQ	Health assessment score
ICAM-1	intracellular adhesion molecule
IFN γ	interferon γ
IL-1 β	interleukin-1 β
IL-1R	receptor pro IL-1
IL-1RAP	IL-1 receptor accessory protein
IL-4	interleukin-4
IL-5	interleukin-5
IL-6	interleukin-6
IL-7	interleukin-7
IL-8	interleukin-8
IL-13	interleukin-13
IL-17	interleukin-17
IL-22	interleukin-22
IL-22R1	receptor pro IL-22
IL-33	interleukin-33
IL-34	interleukin-34
JAK/STAT	Janus Kinase/Signal transducer and activator of transcription

kDa	kilo Dalton
MAPK/ERK	mitogen activated protein kinase/ extracellular-signal-regulated kinase
MBDA	multi-biomaker disease activity
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MCSF-1	makrofágy-stimulující faktor
MHz	Megahertz
MIP-1	macrophage inflammatory protein-1
MMP-1	metalloproteinase-1
MMP-3	metalloproteinase-3
mRNA	messenger RNA
MRP8/14	myeloid-related protein 8/14
MS US	muskuloskeletal ultrasonography
MT-MMP	membrane-type matrix metalloproteinase
MTP	metatarsophalangeal joint
NK buňky	natural killers
OA	osteoarthritis
OMERACT	Outcome Measures in Rheumatology
PAQR3 a PAQR10	progesterin and adipoQ receptor family member 3 a 10
PBEF	pre-B-cell colony-enhancing factor
PD	Power Doppler
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PIP	Proximal interphalangeal joint
proIL-1	inaktivní prekurzor IL-1
RA	revmatoidní artritida
RANKL	receptor activator of nuclear factor NFkappaB-ligand
RMSEA	root mean square error of approximation
ROC	Receiver operator curve
S100A8/9	calcium-binding protein A8/9
SD	standard deviation
SDAI	Simplified Disease Activity Index
SE	standard error
SJC	swollen joint count
SRMR	standardized root mean square residuals
ST2	Interleukin 1 receptor-like 1
SWEFOT	Swedish Farmacotherapy randomized clinical trial
US	ultrasonography
TGFβ	transforming growth factor beta
TJC	tender joint count
TLI	Tucker Lewis index
TLR-4	toll-like receptor-4
TNFα	tumor nekrotizující faktor alfa
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
YKL-40 (CHI3L1)	chitinase-3-like protein 1

7. POUŽITÁ LITERATURA

Ainola, M. M., et al. (2005). "Pannus invasion and cartilage degradation in rheumatoid arthritis: involvement of MMP-3 and interleukin-1beta." *Clin Exp Rheumatol* 23(5): 644-650.

Alamanos, Y. and A. A. Drosos (2005). "Epidemiology of adult rheumatoid arthritis." *Autoimmun Rev* 4(3): 130-136.

Aletaha, D., et al. (2005). "Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score." *Arthritis Res Ther* 7(4): R796-806.

Alkady, E. A., et al. (2011). "[Serum and synovial adiponectin, resistin, and visfatin levels in rheumatoid arthritis patients. Relation to disease activity]." *Z Rheumatol* 70(7): 602-608.

Andersson, K. B., et al. (1988). "The leucocyte L1 protein: identity with the cystic fibrosis antigen and the calcium-binding MRP-8 and MRP-14 macrophage components." *Scand J Immunol* 28(2): 241-245.

Andres Cerezo, L., et al. (2011). "Decreases in serum levels of S100A8/9 (calprotectin) correlate with improvements in total swollen joint count in patients with recent-onset rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 13(4): R122.

Anink, J., et al. (2015). "MRP8/14 serum levels as a predictor of response to starting and stopping anti-TNF treatment in juvenile idiopathic arthritis." *Arthritis Res Ther* 17: 200.

Arend, W. P. and C. Gabay (2000). "Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist." *Arthritis Res* 2(4): 245-248.

Backhaus, M., et al. (2001). "Guidelines for musculoskeletal ultrasound in rheumatology." *Ann Rheum Dis* 60(7): 641-649.

Backhaus, M., et al. (2009). "Evaluation of a novel 7-joint ultrasound score in daily rheumatologic practice: a pilot project." *Arthritis Rheum* 61(9): 1194-1201.

Baillet, A., et al. (2015). "Evaluation of serum interleukin-6 level as a surrogate marker of synovial inflammation and as a factor of structural progression in early rheumatoid arthritis: results from a French national multicenter cohort." *Arthritis Care Res (Hoboken)* 67(7): 905-912.

Bakker, M. F., et al. (2012). "Performance of a multi-biomarker score measuring rheumatoid arthritis disease activity in the CAMERA tight control study." *Ann Rheum Dis* 71(10): 1692-1697.

Balsa, A., et al. (2010). "Superiority of SDAI over DAS-28 in assessment of remission in rheumatoid arthritis patients using power Doppler ultrasonography as a gold standard." *Rheumatology (Oxford)* 49(4): 683-690.

Baud'huin, M., et al. (2010). "Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis." *J Pathol* 221(1): 77-86.

Berntzen, H. B., et al. (1988). "The major leukocyte protein L1 as an indicator of inflammatory joint disease." *Scand J Rheumatol Suppl* 76: 251-256.

Berntzen, H. B., et al. (1989). "A longitudinal study of the leukocyte protein L1 as an indicator of disease activity in patients with rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 16(11): 1416-1420.

Berntzen, H. B., et al. (1991). "The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis." *Scand J Rheumatol* 20(2): 74-82.

Bokarewa, M., et al. (2003). "Leptin consumption in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 62(10): 952-956.

Bokarewa, M., et al. (2005). "Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties." *J Immunol* 174(9): 5789-5795.

Breitfeld, D., et al. (2000). "Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production." *J Exp Med* 192(11): 1545-1552.

Brennan, F. M., et al. (1989). "Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis." *Lancet* 2(8657): 244-247.

Brennan, F. M., et al. (1992). "TNF alpha--a pivotal role in rheumatoid arthritis?" *Br J Rheumatol* 31(5): 293-298.

Brentano, F., et al. (2007). "Pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin, a new marker of inflammation in rheumatoid arthritis with proinflammatory and matrix-degrading activities." *Arthritis Rheum* 56(9): 2829-2839.

Brink, M., et al. (2016). "Rheumatoid factor isotypes in relation to antibodies against citrullinated peptides and carbamylated proteins before the onset of rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 18: 43.

Brown, A. K., et al. (2008). "An explanation for the apparent dissociation between clinical remission and continued structural deterioration in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 58(10): 2958-2967.

Brown, A. K., et al. (2006). "Presence of significant synovitis in rheumatoid arthritis patients with disease-modifying antirheumatic drug-induced clinical remission: evidence from an imaging study may explain structural progression." *Arthritis Rheum* 54(12): 3761-3773.

Brun, J. G., et al. (1992). "Calprotectin in patients with rheumatoid arthritis: relation to clinical and laboratory variables of disease activity." *J Rheumatol* 19(6): 859-862.

Brun, J. G., et al. (1994). "Measurement of plasma calprotectin as an indicator of arthritis and disease activity in patients with inflammatory rheumatic diseases." *J Rheumatol* 21(4): 733-738.

Bugatti, S., et al. (2012). "Serum levels of CXCL13 are associated with ultrasonographic synovitis and predict power Doppler persistence in early rheumatoid arthritis treated with non-biological disease-modifying anti-rheumatic drugs." *Arthritis Res Ther* 14(1): R34.

Burger, D. and J. M. Dayer (2002). "Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF-alpha production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes." *Ann N Y Acad Sci* 966: 464-473.

Burger, D., et al. (2006). "Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis?" *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20(5): 879-896.

Burrage, P. S., et al. (2006). "Matrix metalloproteinases: role in arthritis." *Front Biosci* 11: 529-543.

Busso, N., et al. (2002). "Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis." *J Immunol* 168(2): 875-882.

Catrina, A. I., et al. (2017). "Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis." *Nat Rev Rheumatol* 13(2): 79-86.

Centola, M., et al. (2013). "Development of a multi-biomarker disease activity test for rheumatoid arthritis." *PLoS One* 8(4): e60635.

Cerezo, L. A., et al. (2015). "Progranulin Is Associated with Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis." *Mediators Inflamm* 2015: 740357.

Cohen, G., et al. (2007). "Radiological damage in patients with rheumatoid arthritis on sustained remission." *Ann Rheum Dis* 66(3): 358-363.

Curtis, J. R., et al. (2012). "Validation of a novel multibiomarker test to assess rheumatoid arthritis disease activity." *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64(12): 1794-1803.

Dale, I., et al. (1985). "Distribution of a new myelomonocytic antigen (L1) in human peripheral blood leukocytes. Immunofluorescence and immunoperoxidase staining features in comparison with lysozyme and lactoferrin." *Am J Clin Pathol* 84(1): 24-34.

Dale, I., et al. (1983). "Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen." *Eur J Biochem* 134(1): 1-6.

Dayer, J. M., et al. (1986). "Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells." *J Clin Invest* 77(2): 645-648.

Del Puente, A., et al. (1989). "High incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Pima Indians." *Am J Epidemiol* 129(6): 1170-1178.

Detert, J., et al. (2010). "The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease." *Arthritis Res Ther* 12(5): 218.

do Prado, A. D., et al. (2016). "Ultrasound power Doppler synovitis is associated with plasma IL-6 in established rheumatoid arthritis." *Cytokine* 83: 27-32.

Dumoutier, L., et al. (2000). "Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9." *J Immunol* 164(4): 1814-1819.

Ebina, K., et al. (2009). "Serum adiponectin concentrations correlate with severity of rheumatoid arthritis evaluated by extent of joint destruction." *Clin Rheumatol* 28(4): 445-451.

Elliott, M. J., et al. (1993). "Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha." *Arthritis Rheum* 36(12): 1681-1690.

Fantuzzi, G. (2005). "Adipose tissue, adipokines, and inflammation." *J Allergy Clin Immunol* 115(5): 911-919; quiz 920.

Fasshauer, M., et al. (2003). "Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 301(4): 1045-1050.

Feldmann, M., et al. (2004). "The transfer of a laboratory based hypothesis to a clinically useful therapy: the development of anti-TNF therapy of rheumatoid arthritis." *Best Pract Res Clin Rheumatol* 18(1): 59-80.

Foell, D. and J. Roth (2004). "Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease." *Arthritis Rheum* 50(12): 3762-3771.

Foell, D., et al. (2010). "Methotrexate withdrawal at 6 vs 12 months in juvenile idiopathic arthritis in remission: a randomized clinical trial." *JAMA* 303(13): 1266-1273.

Frosch, M., et al. (2000). "Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 43(3): 628-637.

Fry, T. J. and C. L. Mackall (2002). "Interleukin-7: from bench to clinic." *Blood* 99(11): 3892-3904.

Fukuhara, A., et al. (2005). "Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin." *Science* 307(5708): 426-430.

Gan, R. W., et al. (2015). "Anti-carbamylated protein antibodies are present prior to rheumatoid arthritis and are associated with its future diagnosis." *J Rheumatol* 42(4): 572-579.

Garcia-Arias, M., et al. (2013). "Calprotectin in rheumatoid arthritis : association with disease activity in a cross-sectional and a longitudinal cohort." *Mol Diagn Ther* 17(1): 49-56.

Garitaonandia, I., et al. (2009). "Adiponectin identified as an agonist for PAQR3/RKTG using a yeast-based assay system." *J Recept Signal Transduct Res* 29(1): 67-73.

Ghosh, S., et al. (2003). "The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: functional implications." *Gene* 305(1): 27-34.

Gonez, L. J., et al. (2008). "Pancreatic expression and mitochondrial localization of the progestin-adipoQ receptor PAQR10." *Mol Med* 14(11-12): 697-704.

Gonzalez-Gay, M. A., et al. (2008). "Anti-TNF-alpha therapy modulates resistin in patients with rheumatoid arthritis." *Clin Exp Rheumatol* 26(2): 311-316.

Gonzalez-Gay, M. A., et al. (2008). "High-grade inflammation, circulating adiponectin concentrations and cardiovascular risk factors in severe rheumatoid arthritis." *Clin Exp Rheumatol* 26(4): 596-603.

Gosset, M., et al. (2008). "Crucial role of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in matrix degradation and prostaglandin E2 synthesis in chondrocytes: possible influence on osteoarthritis." *Arthritis Rheum* 58(5): 1399-1409.

Gruys, E., et al. (2005). "Acute phase reaction and acute phase proteins." *J Zhejiang Univ Sci B* 6(11): 1045-1056.

Guo, F., et al. (2010). "Granulin-epithelin precursor binds directly to ADAMTS-7 and ADAMTS-12 and inhibits their degradation of cartilage oligomeric matrix protein." *Arthritis Rheum* 62(7): 2023-2036.

Hambardzumyan, K., et al. (2015). "Pretreatment multi-biomarker disease activity score and radiographic progression in early RA: results from the SWEFOT trial." *Ann Rheum Dis* 74(6): 1102-1109.

Hambardzumyan, K., et al. (2016). "Association of a multibiomarker disease activity score at multiple time-points with radiographic progression in rheumatoid arthritis: results from the SWEFOT trial." *RMD Open* 2(1): e000197.

Hammer, H. B., et al. (2011). "The soluble biomarker calprotectin (an S100 protein) is associated to ultrasonographic synovitis scores and is sensitive to change in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab." *Arthritis Res Ther* 13(5): R178.

Hammer, H. B., et al. (2008). "Calprotectin (a major leucocyte protein) is associated with the levels of anti-CCP and rheumatoid factor in a longitudinal study of patients with very early rheumatoid arthritis." *Scand J Rheumatol* 37(3): 179-182.

Hammer, H. B., et al. (2007). "Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 66(8): 1093-1097.

Hammer, H. B., et al. (2010). "Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 69(1): 150-154.

Hanova, P., et al. (2006). "Epidemiology of rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis and gout in two regions of the Czech Republic in a descriptive population-based survey in 2002-2003." *Clin Exp Rheumatol* 24(5): 499-507.

Haworth, C., et al. (1991). "Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor- α ." *Eur J Immunol* 21(10): 2575-2579.

Hida, K., et al. (2005). "Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(30): 10610-10615.

Hirata, S., et al. (2013). "A multi-biomarker score measures rheumatoid arthritis disease activity in the BeSt study." *Rheumatology (Oxford)* 52(7): 1202-1207.

Hitchon, C. A., et al. (2004). "A distinct multicytokine profile is associated with anti-cyclical citrullinated peptide antibodies in patients with early untreated inflammatory arthritis." *J Rheumatol* 31(12): 2336-2346.

Hofmeister, R., et al. (1999). "Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action." *Cytokine Growth Factor Rev* 10(1): 41-60.

Houseman, M., et al. (2012). "Baseline serum MMP-3 levels in patients with Rheumatoid Arthritis are still independently predictive of radiographic progression in a longitudinal observational cohort at 8 years follow up." *Arthritis Res Ther* 14(1): R30.

Hu, E., et al. (1996). "AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity." *J Biol Chem* 271(18): 10697-10703.

Hultgren, O. H. and A. Tarkowski (2001). "Leptin in septic arthritis: decreased levels during infection and amelioration of disease activity upon its administration." *Arthritis Res* 3(6): 389-394.

Chang, S. H., et al. (2015). "Baseline serum interleukin-34 levels independently predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis." *Rheumatol Int* 35(1): 71-79.

Chemel, M., et al. (2012). "Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients." *Ann Rheum Dis* 71(1): 150-154.

Ikeuchi, H., et al. (2005). "Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine." *Arthritis Rheum* 52(4): 1037-1046.

Ishiguro, N., et al. (1996). "Determination of stromelysin-1, 72 and 92 kDa type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-2 in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 23(9): 1599-1604.

Jia, S. H., et al. (2004). "Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis." *J Clin Invest* 113(9): 1318-1327.

Jiang, Q., et al. (2005). "Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin." *Cytokine Growth Factor Rev* 16(4-5): 513-533.

Johne, B., et al. (1997). "Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin." *Mol Pathol* 50(3): 113-123.

Jonsson, M. K., et al. (2017). "Calprotectin as a marker of inflammation in patients with early rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 76(12): 2031-2037.

Kaser, S., et al. (2003). "Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* 309(2): 286-290.

Kay, J. and L. Calabrese (2004). "The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Rheumatology (Oxford)* 43 Suppl 3: iii2-iii9.

Kelly, S., et al. (2015). "Angiogenic gene expression and vascular density are reflected in ultrasonographic features of synovitis in early Rheumatoid Arthritis: an observational study." *Arthritis Res Ther* 17: 58.

Kershaw, E. E. and J. S. Flier (2004). "Adipose tissue as an endocrine organ." *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2548-2556.

Klareskog, L., et al. (2006). "A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination." *Arthritis Rheum* 54(1): 38-46.

Knudsen, L. S., et al. (2008). "Biomarkers of inflammation in patients with unclassified polyarthritis and early rheumatoid arthritis. Relationship to disease activity and radiographic outcome." *J Rheumatol* 35(7): 1277-1287.

Konttinen, Y. T., et al. (1999). "Collagenase-3 (MMP-13) and its activators in rheumatoid arthritis: localization in the pannus-hard tissue junction and inhibition by alendronate." *Matrix Biol* 18(4): 401-412.

Koski, J. M., et al. (2006). "Power Doppler ultrasonography and synovitis: correlating ultrasound imaging with histopathological findings and evaluating the performance of ultrasound equipments." *Ann Rheum Dis* 65(12): 1590-1595.

Kumada, M., et al. (2004). "Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages." *Circulation* 109(17): 2046-2049.

Lee, S. S., et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor levels in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis." *Clin Exp Rheumatol* 19(3): 321-324.

Legler, D. F., et al. (1998). "B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5." *J Exp Med* 187(4): 655-660.

Leipe, J., et al. (2011). "Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 70(8): 1453-1457.

Lin, H., et al. (2008). "Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome." *Science* 320(5877): 807-811.

Lipsky, P. E. (2006). "Interleukin-6 and rheumatic diseases." *Arthritis Res Ther* 8 Suppl 2: S4.

Lisignoli, G., et al. (2003). "Human osteoblasts express functional CXC chemokine receptors 3 and 5: activation by their ligands, CXCL10 and CXCL13, significantly induces alkaline phosphatase and beta-N-acetylhexosaminidase release." *J Cell Physiol* 194(1): 71-79.

Luo, S. F., et al. (2010). "Involvement of MAPKs and NF-kappaB in tumor necrosis factor alpha-induced vascular cell adhesion molecule 1 expression in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts." *Arthritis Rheum* 62(1): 105-116.

Maeda, K., et al. (1996). "cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)." *Biochem Biophys Res Commun* 221(2): 286-289.

Maijer, K. I., et al. (2015). "Serum Vasp Levels Are Associated with the Development of Clinically Manifest Arthritis in Autoantibody-Positive Individuals." *PLoS One* 10(12): e0144932.

Mamehara, A., et al. (2010). "Serum matrix metalloproteinase-3 as predictor of joint destruction in rheumatoid arthritis, treated with non-biological disease modifying anti-rheumatic drugs." *Kobe J Med Sci* 56(3): E98-107.

Mattioli, B., et al. (2005). "Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming." *J Immunol* 174(11): 6820-6828.

- Meeuwisse, C. M., et al. (2011). "Identification of CXCL13 as a marker for rheumatoid arthritis outcome using an in silico model of the rheumatic joint." *Arthritis Rheum* 63(5): 1265-1273.
- Moon, S. J., et al. (2013). "Increased levels of interleukin 34 in serum and synovial fluid are associated with rheumatoid factor and anticyclic citrullinated peptide antibody titers in patients with rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 40(11): 1842-1849.
- Mu, R., et al. (2010). "Elevated serum interleukin 33 is associated with autoantibody production in patients with rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 37(10): 2006-2013.
- Nagaev, I. and U. Smith (2001). "Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle." *Biochem Biophys Res Commun* 285(2): 561-564.
- Nakano, Y., et al. (1996). "Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma." *J Biochem* 120(4): 803-812.
- Nam, J. L., et al. (2016). "Ultrasound findings predict progression to inflammatory arthritis in anti-CCP antibody-positive patients without clinical synovitis." *Ann Rheum Dis* 75(12): 2060-2067.
- Naredo, E., et al. (2007). "Longitudinal power Doppler ultrasonographic assessment of joint inflammatory activity in early rheumatoid arthritis: predictive value in disease activity and radiologic progression." *Arthritis Rheum* 57(1): 116-124.
- Netea, M. G., et al. (2010). "IL-1 β processing in host defense: beyond the inflammasomes." *PLoS Pathog* 6(2): e1000661.
- Nordal, H. H., et al. (2017). "Calprotectin (S100A8/A9) has the strongest association with ultrasound-detected synovitis and predicts response to biologic treatment: results from a longitudinal study of patients with established rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 19(1): 3.
- Odink, K., et al. (1987). "Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis." *Nature* 330(6143): 80-82.
- Ohashi, K., et al. (2012). "Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin." *Biochimie* 94(10): 2137-2142.
- Otero, M., et al. (2006). "Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 65(9): 1198-1201.
- Patel, L., et al. (2003). "Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators." *Biochem Biophys Res Commun* 300(2): 472-476.

- Pickens, S. R., et al. (2011). "Characterization of interleukin-7 and interleukin-7 receptor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 63(10): 2884-2893.
- Pincus, T., et al. (2014). "An evidence-based approach to laboratory tests in usual care of patients with rheumatoid arthritis." *Clin Exp Rheumatol* 32(5 Suppl 85): S-23-28.
- Pincus, T. and T. Sokka (2009). "Laboratory tests to assess patients with rheumatoid arthritis: advantages and limitations." *Rheum Dis Clin North Am* 35(4): 731-734, vi-vii.
- Pineiro, R., et al. (2005). "Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes." *FEBS Lett* 579(23): 5163-5169.
- Ponchel, F., et al. (2005). "Interleukin-7 deficiency in rheumatoid arthritis: consequences for therapy-induced lymphopenia." *Arthritis Res Ther* 7(1): R80-92.
- Prevoo, M. L., et al. (1995). "Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 38(1): 44-48.
- Reynisdottir, G., et al. (2014). "Structural changes and antibody enrichment in the lungs are early features of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheumatol* 66(1): 31-39.
- Rho, Y. H., et al. (2009). "Adipocytokines are associated with radiographic joint damage in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 60(7): 1906-1914.
- Rioja, I., et al. (2008). "Potential novel biomarkers of disease activity in rheumatoid arthritis patients: CXCL13, CCL23, transforming growth factor alpha, tumor necrosis factor receptor superfamily member 9, and macrophage colony-stimulating factor." *Arthritis Rheum* 58(8): 2257-2267.
- Rongvaux, A., et al. (2002). "Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis." *Eur J Immunol* 32(11): 3225-3234.
- Samal, B., et al. (1994). "Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor." *Mol Cell Biol* 14(2): 1431-1437.
- Scire, C. A., et al. (2009). "Ultrasonographic evaluation of joint involvement in early rheumatoid arthritis in clinical remission: power Doppler signal predicts short-term relapse." *Rheumatology (Oxford)* 48(9): 1092-1097.
- Sellam, J., et al. (2016). "Serum IL-33, a new marker predicting response to rituximab in rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 18(1): 294.
- Senolt, L., et al. (2007). "Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum." *Ann Rheum Dis* 66(4): 458-463.

Senolt, L., et al. (2010). "Vaspin and omentin: new adipokines differentially regulated at the site of inflammation in rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 69(7): 1410-1411.

Sglunda, O., et al. (2014). "Decreased circulating visfatin is associated with improved disease activity in early rheumatoid arthritis: data from the PERAC cohort." *PLoS One* 9(7): e103495.

Shi, J., et al. (2013). "Anti-carbamylated protein antibodies are present in arthralgia patients and predict the development of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 65(4): 911-915.

Shi, K., et al. (2001). "Lymphoid chemokine B cell-attracting chemokine-1 (CXCL13) is expressed in germinal center of ectopic lymphoid follicles within the synovium of chronic arthritis patients." *J Immunol* 166(1): 650-655.

Shiozawa, S., et al. (1983). "Morphologic observations in the early phase of the cartilage-pannus junction. Light and electron microscopic studies of active cellular pannus." *Arthritis Rheum* 26(4): 472-478.

Schaerli, P., et al. (2000). "CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function." *J Exp Med* 192(11): 1553-1562.

Schaffler, A., et al. (2005). "Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue." *Biochim Biophys Acta* 1732(1-3): 96-102.

Scherer, P. E., et al. (1995). "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes." *J Biol Chem* 270(45): 26746-26749.

Schmidt, W. A. (2004). "Doppler sonography in rheumatology." *Best Pract Res Clin Rheumatol* 18(6): 827-846.

Schmidt, W. A. and M. Backhaus (2008). "What the practising rheumatologist needs to know about the technical fundamentals of ultrasonography." *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22(6): 981-999.

Silman, A. J., et al. (1993). "Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study." *Br J Rheumatol* 32(10): 903-907.

Smolen, J. S., et al. (2008). "The need for prognosticators in rheumatoid arthritis. Biological and clinical markers: where are we now?" *Arthritis Res Ther* 10(3): 208.

Smolen, J. S., et al. (2003). "A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice." *Rheumatology (Oxford)* 42(2): 244-257.

Sokka, T. (2003). "Work disability in early rheumatoid arthritis." *Clin Exp Rheumatol* 21(5 Suppl 31): S71-74.

Sokka, T. and T. Pincus (2009). "Erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein, or rheumatoid factor are normal at presentation in 35%-45% of patients with rheumatoid

arthritis seen between 1980 and 2004: analyses from Finland and the United States." *J Rheumatol* 36(7): 1387-1390.

Sone, H., et al. (2001). "Elevated levels of vascular endothelial growth factor in the sera of patients with rheumatoid arthritis correlation with disease activity." *Life Sci* 69(16): 1861-1869.

Steppan, C. M., et al. (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." *Nature* 409(6818): 307-312.

Sunahori, K., et al. (2006). "The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 8(3): R69.

Tan, B. K., et al. (2010). "Omentin: a novel link between inflammation, diabetes, and cardiovascular disease." *Trends Cardiovasc Med* 20(5): 143-148.

Tan, W., et al. (2009). "High adiponectin and adiponectin receptor 1 expression in synovial fluids and synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis." *Semin Arthritis Rheum* 38(6): 420-427.

Tang, S., et al. (2013). "Increased IL-33 in synovial fluid and paired serum is associated with disease activity and autoantibodies in rheumatoid arthritis." *Clin Dev Immunol* 2013: 985301.

Tang, W., et al. (2011). "The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice." *Science* 332(6028): 478-484.

Tian, G., et al. (2014). "Emerging role of leptin in rheumatoid arthritis." *Clin Exp Immunol* 177(3): 557-570.

Toraldo, G., et al. (2003). "IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha from T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1): 125-130.

Torp-Pedersen, S., et al. (2015). "Power and color Doppler ultrasound settings for inflammatory flow: impact on scoring of disease activity in patients with rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheumatol* 67(2): 386-395.

van de Stadt, L. A., et al. (2010). "The value of ultrasonography in predicting arthritis in auto-antibody positive arthralgia patients: a prospective cohort study." *Arthritis Res Ther* 12(3): R98.

van de Stadt, L. A., et al. (2011). "Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 63(11): 3226-3233.

van Roon, J. A., et al. (2003). "Interleukin 7 stimulates tumour necrosis factor alpha and Th1 cytokine production in joints of patients with rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 62(2): 113-119.

van Roon, J. A., et al. (2005). "Increased intraarticular interleukin-7 in rheumatoid arthritis patients stimulates cell contact-dependent activation of CD4(+) T cells and macrophages." *Arthritis Rheum* 52(6): 1700-1710.

Wakefield, R. J., et al. (2003). "Power Doppler sonography: improving disease activity assessment in inflammatory musculoskeletal disease." *Arthritis Rheum* 48(2): 285-288.

Wei, S., et al. (2005). "IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis." *J Clin Invest* 115(2): 282-290.

Wilkinson, M. M., et al. (1988). "Expression pattern of two related cystic fibrosis-associated calcium-binding proteins in normal and abnormal tissues." *J Cell Sci* 91 (Pt 2): 221-230.

Williams, R. O., et al. (1992). "Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20): 9784-9788.

Wong, C. K., et al. (2007). "Leptin-mediated cytokine release and migration of eosinophils: implications for immunopathophysiology of allergic inflammation." *Eur J Immunol* 37(8): 2337-2348.

Yamauchi, T., et al. (2003). "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects." *Nature* 423(6941): 762-769.

Zwerina, J., et al. (2007). "TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(28): 11742-11747.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) s impact factorem

1. Hurnakova J, Zavada J, Hanova P, Hulejova H, Klein M, Mann H, Sleglova O, Olejarova M, Forejtova S, Ruzickova O, Komarc M, Pavelka K, Senolt L. Serum calprotectin (S100A8/9) is an independent predictor of ultrasound synovitis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015; 17:252. IF 4.5
2. Hurnakova J, Hulejova H, Zavada J, Hanova P, Komarc M, Mann H, Klein M, Sleglova O, Olejarova M, Forejtova S, Ruzickova O, Vencovsky J, Pavelka K, Senolt L. Relationship between serum calprotectin (S100A8/9) and clinical, laboratory and ultrasound parameters of disease activity in rheumatoid arthritis: A large cohort study. *PLoS One*. 2017 Aug 23;12(8). IF 2.8
3. Hurnakova J, Hulejova H, Zavada J, Hanova P, Klein M, Mann H, Sleglova O, Olejarova M, Forejtova S, Ruzickova O, Komarc M, Pavelka K, Senolt L. Serum calprotectin discriminates subclinical disease activity from ultrasound-defined remission in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission, *PLoS One*. 2016;11(11):e0165498. IF 2.8
4. Zavada J, Hanova P, Hurnakova J, Szczukova L, Uher M, Forejtova S, Klein M, Mann H, Olejarova M, Ruzickova O, Sleglova O, Hejduk K, Pavelka K. The relationship between synovitis quantified by an ultrasound 7-joint inflammation score and physical disability in rheumatoid arthritis – a cohort study. *Arthritis Res Ther*. 2017; 19: 5. IF 4.5
5. Hurnakova J, Hulejova H, Zavada J, Hanova P, Klein M, Mann H, Sleglova O, Olejarova M, Forejtova S, Ruzickova O, Komarc M, Pavelka K, Senolt L. Serum calprotectin might better reflect inflammatory activity in patients with active rheumatoid arthritis despite normal to low C-reactive protein, *submitováno do Clinical Rheumatology*

6. Hurnáková J, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L. Novel biomarkers for rheumatoid arthritis: how far have we come? (Biomarkers for rheumatoid arthritis: systematic review article, future perspectives), v stádiu revizí

b) recenzované

1. Hurňáková J, Gatterová J, Pavelka K. Ultrazvukové skórovací indexy při hodnocení aktivity revmatoidní artritidy. *Česká revmatologie* 2012;12, s. 62-72.

2. Hurňáková J. Monitorace aktivity revmatoidní artritidy pomocí muskuloskeletálního ultrazvuku. *Acta medicae*, 2013, sv. 05/2013, s. 70–72. ISSN 1805-398X.

3. Hurňáková J, Horváth R, Gatterová J, Pavelka K. Ultrazvuk při hodnocení synovitidy a entezitidy u revmatoidní artritidy a spondyloartritid. *Ortopedie ročník* 10 6/2016, s. 282-288, ISSN 1802-1727.

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

Recenzované

1. Hurňáková J, Pavelka K. Terapie aktivní, progredující a refrakterní revmatoidní artritidy v minulosti a nyní. *Remedia*, 2013;6, s.70-72.

2. Hurňáková J, Horváth R, Gatterová J, Pavelka K. Ultrazvuková detekce entezitid u pacientů se spondyloartritidou, *Čes. Revmatol.*, 23, 2015, No. 3, p. 91-99.

3. Hurňáková J, Horváth R, Gkalpakiotis S, Pavelka K. Muskuloskeletální ultrasonografie u pacientů s psoriázou a psoriatickou artritidou. *Česko-slovenská Dermatologi*, 91, 2016, č. 4, str. 154-204.

4. Horváth R, Hurňáková J, Janková R, Philipp T, Szczuková L, Hejduk K, Pavelka K. Účinnost první a následné linie léčby adalimumabem u revmatoidní artritidy: analýza dat Českého národního registru ATTRA. *Česká revmatologie* 2016;3(24):78-91.

5. Tegzová D, Hulejová H, Hrušková V, Stibůrková B, Filková M, Forejtová Š, Ciferská H, Bečvář R, Tomčík M, Mann H, Závada J, Růžicková O, Šléglová O, Hurňáková J, Olejárová M. Novinky a poznatky z kongresu ACR 2015. Česká revmatologie. 2016; 24 (1): 38-47.

6. Horváth R, Hurňáková J, Janková R, Szczuková L, Pavelka K. Účinnost a bezpečnost terapie adalimumabem v léčbě ankylozující spondylitidy. Acta medicae, 2017; 6: 40-45.

Abstrakta

1. Hurnakova J, Závada J, Senolt L, Mann H, Klein M, Hanova P, Forejtova S, Olejarova M, Ruzickova O, Sleglova O, Pavelka K. Interobserver and intraobserver reliability in musculoskeletal ultrasonography for a rheumatoid arthritis activity assesement. CECR 2012 (9th Central European Congress of Rheumatology and 3rd Annual Meeting of Polish Rheumatologists), Krakow, Poland, 1-3rd September 2012.

2. Hurnakova J, Klein M, Hanova P, Forejtova S, Mann H, Olejarova M, Ruzickova O, Sleglova O, Závada J, Senolt L, Pavelka K, Senolt L. The US7 score is a sensitive-to-change method for evaluating joint inflammation in rheumatoid arthritis among rheumatologists with basic or intermediate level of ultrasound training. EULAR 2013 congress (The European League Against Rheumatism), Madrid, Spain, 12.-15th June 2013. Ann Rheum Dis. 2013;72(Suppl3):548.

3. Hurnakova J, Závada J, Senolt L, Mann H, Klein M, Hanova P, Forejtova S, Olejarova O, Ruzickova O, Sleglova O, Pavelka K. The 7-Joint Ultrasound Score Is a Feasible Tool For Evaluating Joint Inflammation In Rheumatoid Arthritis Patients. Experience Among Rheumatologists With Basic Or Intermediate Level Of Ultrasound Training. American College of Rheumatology San Diego, CA, USA, October 25 – 30th. November 2013. Arthritis Rheum 2013;65(10 Suppl):S830.

4. Hurnakova J, Hanova P, Hulejova H, Zavada J, Klein M, Mann H, Sleglova O, Olejarova M, Forejtova S, Ruzickova O, Komarc M, Pavelka K, Senolt L. Serum calprotectin (S100A8/9) correlates with clinical and ultrasound outcomes in patients with rheumatoid arthritis. EULAR 2014 congress (The European League Against Rheumatism), Paris, France, 11 – 14th June 2014. Ann Rheum Dis 2014;**73**:658.

5. Hurnakova J, Hanova P, Hulejova H, Zavada J, Klein M, Mann H, Sleglova O, Olejarova M, Forejtova S, Ruzickova O, Komarc M, Pavelka K, Senolt L. Calprotectin (S100A8/9) Is an Independent Predictor of Ultrasound Synovitis in Patients with Rheumatoid Arthritis. ACR congress 2014 (American College of Rheumatology), Boston, MA, USA, November 14 – 19th 2014.

6. Hanova P, Zavada J, Hurnakova J, Klein M, Sleglova O, Olejarova M, Komarc M, Senolt L, Pavelka K. Seven Joints Ultrasound Scoring System May be Useful and Effective in Assessing Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis in the State of Remission in Daily Clinical Practice. ACR congress 2014 (American College of Rheumatology), Boston, USA, Arthritis Rheum 2014; 66(Suppl 11).

7. Hanova P, Zavada J, Hurnakova J, Klein M, K. Pavelka. Potential of US7 Score in Evaluating of Disease Activity of Patients with Rheumatoid Arthritis in the State of Remission. EULAR 2014 congress (The European League Against Rheumatism). Ann Rheum Dis 2014;73:Suppl 2: 664.

8. Hurnakova J, Zavada J, Hulejova H, Hanova P, Komarc M, Klein M, Mann H, Sleglova O, Olejarova M, Forejtova S, Ruzickova O, Vencovsky J, Pavelka K, Senolt L. Serum calprotectin (S100A8/9) is associated with ultrasound-determined active synovitis in patients with rheumatoid arthritis. EULAR 2015 congress (The European League Against Rheumatism), Rome, Italy, 10 – 13th June 2015. Ann Rheum Dis 2015;74:642.

9. Hurnakova J, Zavada J, Hanova P, Hulejová H, Klein M, Mann H, Sleglova O, Olejarova M, Forejtová , Ruzickova O, Komarc M, Vencovsky J, Pavelka K, Senolt L. Serum Calprotectin Levels Correlate with Ultrasonographic Synovitis in

Rheumatoid Arthritis Patients. American College of Rheumatology, San Francisco, CA, USA, November 6 – 11th. November 2015. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67 (suppl 10).

10. Hurnakova J, Di Matteo A, Salaffi F, Carotti M, Cipolletta E, Draghessi A, Di Donato E, Di Carlo M, Lato V, Pavelka K, Filippucci E, Grassi W. Ultrasound assessment of cartilage damage at metacarpal head level in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. EULAR 2016 congress (The European League Against Rheumatism), London, UK, 7 - 11th June 2016. *Ann Rheum Dis* 2016;75:867.

11. Hurnakova J, Hulejova H, Zavada J, Komarc M, Hanova P, Klein M, Mann H, Sleglova O, Olejarova M, Forejtova S, Ruzickova O, Vencovsky J, Pavelka K, Senolt L. Serum calprotectin distinguishes subclinical disease activity from ultrasound-defined remission in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission. Central European Congress of Rheumatology (CECR). Prague, Czech Republic, 8-10th December 2016.

12. Di Matteo A, Satulu I, Di Carlo M, Lato V, Draghessi A, Di Donato E, J. Hurnakova J, Filippucci E, Grassi W. Musculoskeletal Ultrasound (MSUS) Showing Enteseal Involvement in Patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE): Something Unexpected. EULAR 2016 congress (The European League Against Rheumatism), London, UK, 7 - 11th June 2016. *Ann Rheum Dis* 2016;75:869.

13. Zavada J, Hanova P, Hurnakova J, Uher M, Puczokova L, Forejtova S, Klein M, Mann H, Olejarova M, Sleglova O, Pavelka K. Association between The 7-Joint Ultrasound Score (US7S) and Physical Function in Rheumatoid Arthritis. EULAR 2016 congress (The European League Against Rheumatism), London, UK, 7 - 11th June 2016. *Ann Rheum Dis* 2016;75:632.

14. Hanova P, Zavada J, Hurnakova J, Mann H, Klein M, Sleglova O, Olejarova M, Ruzickova O, Forejtova S, Komarc M, Gatterova J, Pavelka K. Impact of education in musculoskeletal ultrasonography: good to excellent reliability results

in modified US7 scoring system after one year of continuing education since basic or intermediate level of training. EULAR 2016 congress (The European League Against Rheumatism), London, UK, 7 - 11th June 2016. *Ann Rheum Dis* 2016;75:637.

15. Zavada J, Hanova P, Hurnakova J, Szczukova L, Uher M, Forejtová S, Klein M, Mann H, Olejarova M, Sleglova O, Ruzickova O, Pavelka K. Synovitis Assessed By the German 7-Joint Ultrasound Score (US7S) Is Associated with the Reversible Activity-Related Component of Physical Disability in Patients with Rheumatoid Arthritis, ACR 2016 (American College of Rheumatology), Boston, USA 3-8th November 2016, *Arthritis Rheumatol* 2016; 68 (suppl 10).

16. Serum calprotectin may reflect inflammatory activity in patients with rheumatoid arthritis with active rheumatoid arthritis despite normal C-reactive protein. Hurnakova J, Zavada J, Hanova P, Hulejová H, Klein M, Mann HF, Sleglova O, Olejarova M, Forejtova S, Ruzickova O, Komarc M, Vencovsky J, Pavelka K, Senolt L. EULAR 2017 congress (The European League Against Rheumatism), Madrid, Spain, 14 - 17th June 2017.

17. Di Matteo A, Filippucci E, Cipolletta E, Lato V, Hurnakova J, Satulu I, De Angelis R, Grassi W. Enteseal Involvement in Systemic Lupus Erythematosus: An Ultrasound Study. ACR congress 2017 (American College of Rheumatology), San Diego, CA, USA 3-8th November 2017. *Arthritis Rheumatol* 2017; 69 (suppl 10).

18. Hurňáková J, Hánová P, Závada J, Forejtová S, Klein M, Mann H, Olejárová M, Růžičková O, Šléglová O, Pavelka K. Interobserver and intraobserver reliability in musculoskeletal ultrasonography for a rheumatoid arthritis activity assessment. Abstrakt Sjezd českých a slovenských revmatologů Olomouce 2012.(Příloha č. 6)

19. Hánová P, Klein M, Závada J, Šléglová O, Hurňáková J, Pavelka K. Hodnocení remise u revmatoidní artritidy. Olomouc 2012, Abstrakt (Příloha č. 8a)

20. Hurňáková J. Sonografické skórovací indexy a možnosti využití v konceptu „Treat-to-target“. Třeboňské revmatologické dny 2013, 9.-11.1.2013, Třeboň
21. Hánová P., Závada J, Klein M, Šléglová O., Olejárová M., Hurňáková J., Pavelka K. Revmatoidní artritida – remise. Třeboňské revmatologické dny, Třeboň, 9.-11.1.2013
22. Hurňáková J. Ultrazvuk - prediktivní marker revmatoidní artritidy? X. Slapské symposium 20.-22.6.2013, Slapy, ČR.
23. Hurňáková J. Využití ultrazvukového skórovacího indexu German US7 v monitoraci aktivity pacientů s revmatoidní artritidou v běžné klinické praxi. 57. zjazd slovenských a českých reumatológov, Žilina, Slovenská republika, 26.-28.9.2013
24. Hánová P., Závada J, Klein M, Šléglová O., Olejárová M., Hurňáková J., Pavelka K. Hodnocení remise revmatoidní artritidy. 57. zjazd slovenských a českých reumatológov, Žilina, Slovenská republika, 26.-28.9.2013.
25. Hurňáková J. Vztah calprotectinu (S100A8/9) s klinickými, laboratorními a ultrazvukovými parametry aktivity revmatoidní artritidy. 58. výroční sjezd českých a slovenských revmatológů - 20.9.2014, Hradec Králové, ČR
26. Význam sérového calprotectinu (S100A8/9) u pacientů s RA v klinické remisi. Hurňáková J. XIII. seminář mladých revmatológů, Špindlerův mlýn 27.-29.5.2016, ČR
27. Ultrazvuková detekce entezitid u pacientů s psoriatickou artritidou. Hurňáková J. Třeboňské revmatologické dny, 9.1.2015, Třeboň, ČR
28. Úskalí hodnocení některých ultrazvukových nálezů. Hurňáková J. Třeboňské revmatologické dny, 9.1.2015, Třeboň, ČR

29. Vztah calprotectinu s klinickými, laboratorními a ultrazvukovými parametry aktivity revmatoidní artritidy. Hurňáková J. XII. seminář mladých revmatologů, Skalní mlýn, Blansko, 14.-16.6.2015.
30. Význam sérového calprotectinu (S100A8/9) u pacientů s RA v klinické remisi. Hurňáková J. XIII. seminář mladých revmatologů, Špindlerův mlýn 27.-29.5.2016.
31. Význam ultrazvukového vyšetření chrupavky u pacientů s revmatoidní artritidou a osteoartrózou. Hurnakova J., Di Matteo A., Salaffi F., Carotti M., Cipolletta E., Draghessi A., Di Donato E., Di Carlo M., Lato V., Horváth R., Pavelka K., Filippucci E., Grassi W. 60. Výroční sjezd českých a slovenských revmatologů, Brno, 28.9.-1.10.2016.
32. Význam sérového calprotectinu (S100A8/9) u pacientů s revmatoidní artritidou v klinické remisi. Hurňáková J., Hulejová H., Závada J., Hánová P., Klein M., Mann H., Šléglová O., Olejárová M., Forejtová Š., Růžičková O., Komarc M., Pavelka K., Šenolt L. Výroční sjezd českých a slovenských revmatologů, Brno, 28.9.-1.10.2016.
33. Závada J, Hanova P, Hurnakova J, Uher M, Puczokova L, Forejtova S, Klein M, Mann H, Olejarova M, Sleglova O, Pavelka K. Asociace ultrazvukových skóre US7 a parametry fyzické funkce. 60. Výroční sjezd českých a slovenských revmatologů, Brno, 28.9.-1.10.2016.
34. Revmatoidní artritida a ultrazvuk. Hurňáková J. Třeboňské revmatologické dny, 8.-10.1.2017.
35. Přínos ultrasonografie při hodnocení remise u RA – fakta a kontroverze. Hurňáková J. XII. Slapské symposium 8.-10.6.2017.

9. PODĚKOVÁNÍ

Na závěr bych velmi ráda poděkovala svému školiteli a řediteli Revmatologického ústavu v Praze, Prof. MUDr. Karlovi Pavelkovi, DrSC., za příkladné vedení, pomoc a podporu při postgraduálním studiu a profesním růstu a za umožnění zahraničních studijních pobytů. Mé poděkování patří i prof. MUDr. Ladislavovi Šenoltovi, který stál při zrodu a řešení vědeckých projektů, za podporu, pomoc a laskavý přístup. Děkuji všem kolegům a spoluautorům v Revmatologickém ústavu v Praze, především doc. MUDr. Jakubovi Závadovi, PhD., Ing. Haně Hulejové za odbornou pomoc při řešení projektů. Mé poděkování patří i kolegům na všech partnerských pracovištích, RNDr. Lence Palové-Jelínkové, PhD. a Mgr. Kláře Daňové za pomoc a spolupráci při řešení projektů a Mgr. Martinovi Komarcovi za pomoc při statistických analýzách. Vřele děkuji také mé rodině za jejich laskavou podporu a trpělivost. Řešení projektů, ze kterých vychází disertační práce, by se neobešlo bez finanční podpory následujících institucí: Výzkumné záměry MZČR č. 023728, grant IGA MZČR NT/12437-5, grant GAUK 1010213, PRVOUK, SVV 260 031 a SVV 260 373.

10. PŘÍLOHY

Součástí přílohy jsou publikace k tématu disertační práce.

Seznam příloh

1. Hurnakova J, Zavada J, Hanova P, Hulejova H, Klein M, Mann H, Sleglova O, Olejarova M, Forejtova S, Ruzickova O, Komarc M, Pavelka K, Senolt L. Serum calprotectin (S100A8/9) is an independent predictor of ultrasound synovitis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2015; 17:252. IF 4.5.
2. Hurnakova J, Hulejova H, Zavada J, Hanova P, Komarc M, Mann H, Klein M, Sleglova O, Olejarova M, Forejtova S, Ruzickova O, Vencovsky J, Pavelka K, Senolt L. Relationship between serum calprotectin (S100A8/9) and clinical, laboratory and ultrasound parameters of disease activity in rheumatoid arthritis: A large cohort study. *PLoS One*. 2017 Aug 23;12(8). IF 2.8.
3. Hurnakova J, Hulejova H, Zavada J, Hanova P, Klein M, Mann H, Sleglova O, Olejarova M, Forejtova S, Ruzickova O, Komarc M, Pavelka K, Senolt L. Serum calprotectin discriminates subclinical disease activity from ultrasound-defined remission in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission, *PLoS One*. 2016;11(11):e0165498. IF 2.8.
4. Zavada J, Hanova P, Hurnakova J, Szczukova L, Uher M, Forejtova S, Klein M, Mann H, Olejarova M, Ruzickova O, Sleglova O, Hejduk K, Pavelka K. The relationship between synovitis quantified by an ultrasound 7-joint inflammation score and physical disability in rheumatoid arthritis – a cohort study. *Arthritis Res Ther*. 2017; 19: 5. IF 4.5.